



UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

- MEDIZINISCHE FAKULTÄT HOMBURG/SAAR -

Aus der
Fachrichtung Anatomie und Zellbiologie ,
Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
Frau Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier

Connexin-Expression
im Urothelkarzinom der menschlichen Harnblase

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS

DER MEDIZIN

der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2017

vorgelegt von Detlev Comberg

geboren am 11. Mai 1966 in Duisburg

Tag der mündlichen Prüfung:

Betreuer: Prof. Dr. med. T. Tschernig

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

Berichterstatter:

Meiner Frau und meiner Familie für Geduld und Vertrauen

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	Seite	7
2. Summary	Seite	9
3. Einleitung	Seite	10
4. Fragestellung	Seite	19
5. Material und Methodik	Seite	20
6. Ergebnisse	Seite	27
7. Diskussion	Seite	62
8. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick	Seite	65
9. Literaturverzeichnis	Seite	66
10.Danksagung	Seite	71
11.Veröffentlichung	Seite	72
12.Lebenslauf	Seite	73

1. Zusammenfassung

Connexin 43 stellt ein Eiweiß dar, welches in der Kommunikation der Zellen über Zellverbindungskanäle (Gap junctions), die die Kommunikation der Zellen untereinander regeln, wichtig für die Regulation der Vermehrung und der Spezialisierung von Zellen ist. Die Zellverbindungskanäle setzen sich aus unterschiedlichen der 21 beim Menschen bekannten Connexinen zusammen. So hat sich beim Menschen bislang Connexin 43 und Connexin 26 im Urothel gefunden. Ihr Einfluss auf Urothelkarzinome wird unterschiedlich bewertet: Sowohl tumorhemmend, als auch tumorfördernd. Zunächst wurde vermutet, dass ein Verlust an Connexinen und dadurch bedingter schlechterer Informationsaustausch der Zellen untereinander gleichbedeutend ist mit einer Entartungsneigung also der vermehrte Connexinnachweis schützend ist. Anders schlussfolgert eine spätere Sichtweise, dass der interzelluläre Informationsaustausch über eine vermehrte Bildung von Connexinen und die Zunahme von Zellverbindungskanälen die Karzinomneigung fördert.

Nach Kenntnis des Autors ist ein Zusammenhang von Connexinen zu menschlichen Urothelkarzinomen bisher nicht untersucht worden. Daher war es das Ziel dieser Arbeit die Proteinexpression von Connexinen (Cx26, Cx29, Cx32, Cx36, Cx43) beispielhaft in Gewebeschnitten von menschlichen Urothelkarzinomen zu prüfen.

Nach Genehmigung der Untersuchung durch die zuständigen Ethikkommissionen Saarland und Rheinland-Pfalz und schriftlicher Einwilligung der Betroffenen wurden Gewebeproben von neun Patienten (5 Männer im Alter von 64-91 Jahren und 4 Frauen im Alter von 46-84 Jahren) während der kurativ-operativen, transurethralen Tumorsanierung sowohl in der eigenen Belegabteilung des Autors im Nardlinikum in Zweibrücken als auch in der Abteilung für Urologie im Klinikum

Saarbrücken gewonnen. Die Proben wurden immunhistochemisch mit polyklonalen Antikörpern gegen Connexin 26, Connexin 29, Connexin 32, Connexin 36 und Connexin 43 gefärbt. Die Diagnose eines Urothelcarcinoms wurde histopathologisch bestätigt und die Bewertung der Färbungen erfolgte durch 3 unabhängige Untersucher.

Connexin 26 liess sich in den Tumorzellen von 2 der 9 Patienten und Connexin 43 in den Tumorzellen von 8 der 9 Patienten nachweisen. Der sporadische Nachweis von Connexin 26 erscheint weniger bedeutsam. Dagegen könnte das Connexin 43 eine Bedeutung für menschliche Urothelkarzinome haben.

Dieses ist ein neuer Fakt, welcher erstmalig vom Autor selbst 2016 veröffentlicht wurde. Weil gesundes menschliches Urothel kein Connexin 43 exprimiert, kann der Nachweis von Connexin 43 als tumorspezifisch oder zumindest als tumorbegleitend angesehen werden.

Noch vor einem Jahrzehnt wurde vermutet, dass der Verlust von Connexin 43 zu malignen Entartungen führt und damit ein therapeutischer Ansatzpunkt sein könnte. Nun aber ist vielmehr im Gegensatz festzustellen, dass Connexin 43 Entartungen fördert. Zumindest hängen die Anhaftung, die Anlagerung und - möglicher Weise - auch die Absiedelung von Urothelkarzinomzellen damit zusammen. Es ist interessant, dass eine sehr frühe Untersuchung schon genau diesen Zusammenhang vermutete.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Connexin 43 Einfluss auf menschliche Urothelkarzinome hat. Eine therapeutische Möglichkeit könnten weitere, umfangreichere und eingehendere Untersuchungen aufdecken. Der Ansatz dieser Untersuchungen sollte sein wie die Bildung von Connexin 43 verhindert oder behindert werden kann.

1. Summary

Gap junctions build channels and are involved in communication between cells. They are involved in cell regulation. Twenty one different molecules form these channels. The gap junction protein connexin 43 has been detected in smooth muscle cells of the urinary bladder. Human urothelium was found to be negative for connexins 40, 43, and 45. Interestingly, connexin 26 has been detected in human urothelium. Gap junctions and connexins might play a role in carcinogenesis. Increased expression of connexins might support carcinogenesis in the urinary bladder. The expression of connexins in bladder cancer of patients has not been investigated previously. In this study a panel of connexins (26, 29, 32, 33, 36, and 43) was investigated in tissue samples of human urothelial carcinoma using immunohistochemistry. Tissue was obtained from nine patients during curative tumor surgery (five male, 64-91 years of age; four females, 46-84 years old). The diagnosis of urothelial carcinoma was confirmed in all cases. Connexin 26 was found in the tumor cells of two of the nine patients whereas connexins 29, 32, 33 and 36 were not found. Connexin 43 was detected in the tumor cells of eight of the nine patients. This finding is most likely to be tumor-associated because normal human urothelium does not produce connexin 43. The high prevalence of its expression indicates that connexin 43 in urothelial cancer is a cofactor in the growth of urothelial carcinomas.

3. Einleitung

Harnblasenkrebs ist eine häufige Erkrankung. Im Hinblick auf die Krebsneuerkrankungen in Deutschland ist die Harnblase nach der Prostata, dem Darm und der Lunge der vierthäufigste Ort für eine Tumorentstehung beim Mann. Bei der Frau findet sich die Harnblase an Position zwölf bei den Krebsneuerkrankungen. Etwa 15.500 Personen, gut ein Drittel davon Frauen, erkrankten im Jahr 2010 an einem invasiven Harnblasenkarzinom. Dazu kamen noch insgesamt mehr als 13.000 Erkrankte an nicht-invasiven papillären Karzinomen und in situ Tumoren der Blase. Die Erkrankungsraten steigen mit dem Alter stetig an, nur etwa jede(r) vierte erkrankt vor dem 65. Lebensjahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei den Männern bei 73 Jahren und bei den Frauen bei 77 Jahren (Robert Koch Institut, 2015). Die demographische Bevölkerungsentwicklung wird in Deutschland mit einem zunehmenden Anteil älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung eine daraus sich ergebende Zunahme der Erkrankungsfälle in den nächsten Jahren bzw. Jahrzehnten mit sich bringen (Sommerauer et al., 2012). Das Robert-Koch-Institut hatte für das Jahr 2016 in Deutschland 11.900 neu diagnostizierte Urothelkarzinome bei Männern und 4.500 Neuerkrankungen bei Frauen erwartet. Das Harnblasenkarzinom ist durch häufige Rezidiv- und Progressionsraten gekennzeichnet (Pashoes et al., 2002). Hieraus ergeben sich für die Patienten intensive Therapieregime und eine teilweise lebenslange Tumornachsorge. Unter ökonomischen Gesichtspunkten ist der Blasentumor der Tumor mit den höchsten Kosten bezogen auf die gesamte Therapie eines Patienten. Für die USA wurden Kosten zwischen 96.000 \$ und 187.000 \$ für die Behandlung eines

Patienten im Jahr 2001 ermittelt (Bottemann et al., 2003), sowie 3,98 Bio \$ Gesamtkosten für das Jahr 2010 mit einer prognostizierten noch einmal deutlichen Steigerung dieser Kosten in den kommenden Jahren (Lee et al., 2011).

Bei den bösartigen Harnblasentumoren handelt es sich überwiegend um Urothelkarzinome, die nicht selten gleichzeitig an verschiedenen Stellen der Harnblase und ableitenden Harnwege vorkommen. Urothelkarzinome nehmen ihren Ursprung im Urothel. Es kommen auch Metaplasien des Urothels zu Plattenepithelkarzinomen vor sowie sich auch Sarkome in den Muskelschichten der Harnblase bilden können. Sie sind ebenso selten wie neuroendokrine Karzinome oder drüsige Adenokarzinome der Harnblase (Damyanov I et al., 2008). Die vorliegende Arbeit prüft die Connexinexpression in der wesentlichen Gruppe der Urothelkarzinome.

Für die Tumorerdrückung haben die interzelluläre Kommunikation und ihre Störungen eine Bedeutung, insbesondere die interzelluläre Kommunikation mittels Connexinen über Zellverbindungskanäle (Gap junctions) und deren Störung (Loewenstein WR, 1979; Yotti LP et al., 1979; Murray AW et al., 1979; Yamasaki H, 1990; Trosko JE et al., 1993; Klaunig JE, 1990; Holder JW et al., 1993). Gap junctions sind interzelluläre Kanäle, die einen direkten Austausch von Ionen und kleinen Molekülen zwischen benachbarten Zellen erlauben. Sie bestehen aus einer Gruppe von durch die Zellmembran reichenden Proteinen welche Connexine genannt werden (Übersicht bei Leithe E et al., 2006).

Connexine gehören zur Familie der Tunnelproteine, welche für Transportaufgaben durch die Zellmembran benötigt werden. Sechs Connexine bilden zusammen ein Gebilde, welches durch den Einfluß von Calcium- und H-Ionen seine Konfiguration dahingehend ändern kann, dass ein zentraler Durchlass entsteht, durch welchen Moleküle

hindurchgelangen können. Dieses ist vergleichbar mit einer Pore. Ein solches Sechsergebilde wird Connexon genannt. Connexone sind in die Zellmembran eingebettet. Zwei gegenüberliegende Connexone von zwei verschiedenen Zellen bilden zusammen einen Zellverbindungskanal für den direkten Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von 1 kDa der Zellen untereinander. Eine Gruppe von Zellverbindungskanälen bildet eine Gap junction.

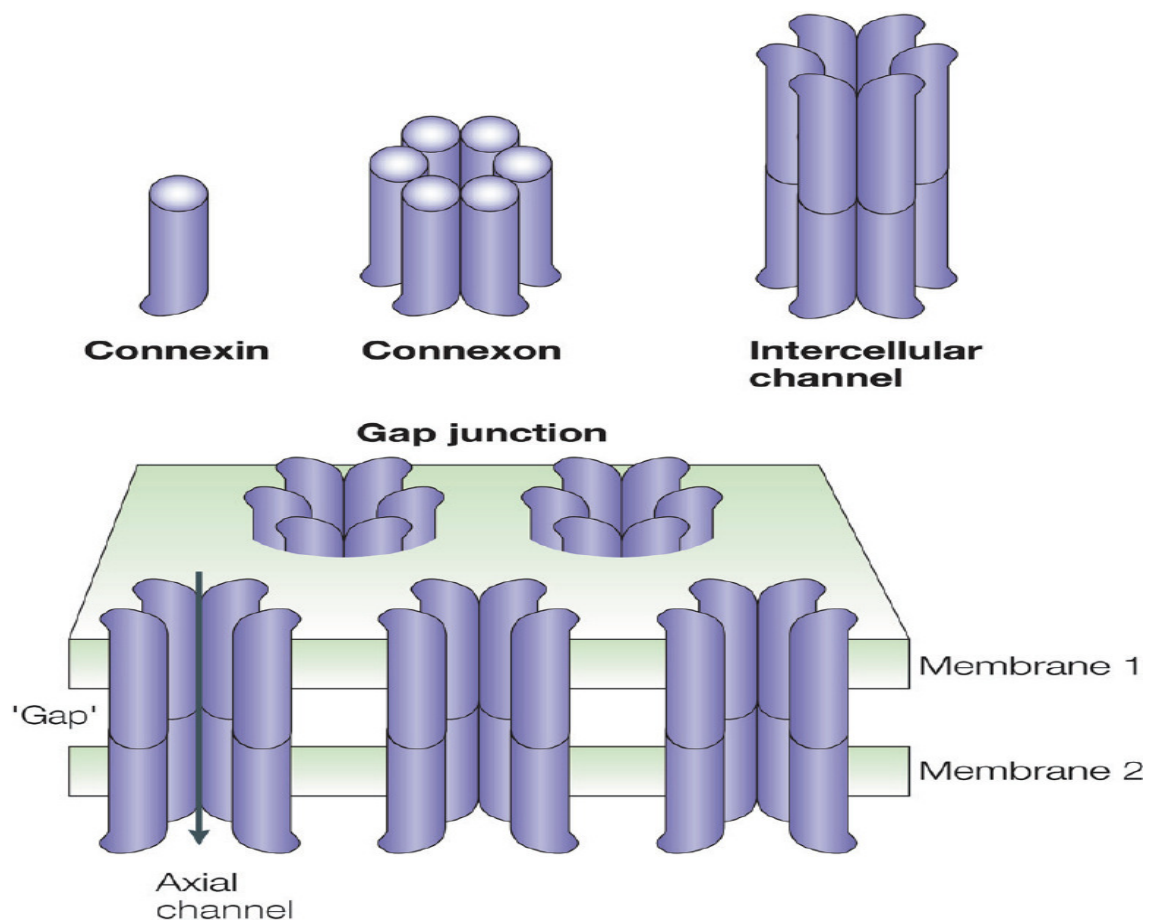


Abbildung 1 zeigt die Beziehung von einem einzelnen Connexin zu einem Connexon, zu einem Zellverbindungskanal und zu einer Gap Junction. Diese modifizierte Darstellung ist aus Nature Reviews Molecular Cell Biology entnommen (Goodenough and Paul, 2003)

Bisher sind beim Menschen 21 verschiedene Connexine bekannt, bei der Maus 20 (Laird DW, 2006). Meist wird in der Nomenklatur Connexin mit Cx abgekürzt und zusätzlich eine Zahl angehängt, welche die molare Masse des Connexins angibt. So findet sich beispielsweise Cx32 in den Myelinscheiden von Oligodendrozyten und in der Leber, Cx43 in Astrozyten, Cx26 im Innenohr und eine Mutation von Cx26 wird in jedem 4.-3. Fall für die rezessiv vererbte Schwerhörigkeit verantwortlich gemacht (Laird DW, 2006; Beyer EC et al., 1990)

In der Ansicht über die Bedeutung von Connexinen im Urothelkarzinom hat in den letzten Jahrzehnten ein Paradigmenwandel stattgefunden. Die initiale Bewertung stellte fest, dass eine vermehrte interzelluläre Kommunikation über Zellverbindungen oder vermehrte Ausprägung von Connexinen einen Wachstumsvorteil im Krebswachstum von Rattenblasen darstellt (Asamoto M et al., 1994). Die zunehmende Connexinexpression war also gleichbedeutend mit einer gesteigerten Cancerogenität. Aber auch ein Mangel oder Verlust an Connexin kann die Cancerogenität fördern. Dieses gegenteilige Ergebnis wurde aus einer erneuten Datenauswertung über die gestörte interzelluläre Kommunikation, die mit Hilfe von gap junctions stattfindet, gefolgert (Mesnil M et al., 2005). Hierzu wurden retrospektiv über 4 Jahrzehnte vorliegende Untersuchungsergebnisse speziell unter dem Aspekt neu ausgewertet, welche Rolle Connexine haben. Die Neuauswertung der Daten bezog sich ausschließlich auf Beobachtungen bei Mäusen und es konnte gezeigt werden, dass neben dem Nachweis verschiedener Connexine (Cx26, Cx30, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46) in verschiedenen Geweben speziell das Fehlen von Cx32 in Mäuselebern mit einer höheren Rate von Lebertumoren einherging. Daraus hätte sich auch ein entsprechender Therapieansatz mit dem Ziel der Einflußnahme auf gap

junctions und Connexine ergeben (Kandouz M et al., 2010). Connexine sollten also nicht cancerogen sondern protektiv wirken.

In der Auswertung einer späteren Studie zeigte es sich, dass gap junctions auf verschiedene Weisen Einfluss auf Tumore haben und zwar abhängig vom Stadium der Tumorprogression. Die Daten ließen vermuten, dass Connexine Einfluss auf das Zellwachstum haben durch Kontrolle der Genausprägungen über eine Vielzahl von Vorgängen sowohl zum Teil unabhängig von der Kommunikationsfähigkeit der gap junction als auch zum Teil abhängig davon. Damit stellte sich der ursprüngliche Zusammenhang von 1994, nämlich dass Connexine sowohl nachteiligen Einfluss auf die Tumorentwicklung an sich, als auch auf ihr Wachstum sowie die Entwicklung von Metastasen nehmen (Cronier L et al., 2008) als wahrscheinlicher heraus, womit die zwischenzeitliche Ansicht widerlegt sein könnte.

In gesundem Harnblasengewebe sind Connexine schon nachgewiesen worden. In Biopsien von Harnblasenmuskeln von gesunden nicht obstruktiven stabilen menschlichen Harnblasen fand sich ultrastrukturell, molekularbiologisch und immunhistochemisch das Gap junction-Protein Connexin Cx45. Sowohl in der Transmissions- und Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie hatten sich gap junctions an Zellmembranen von glatten Muskelzellen des menschlichen Harnblasenmuskels nachweisen lassen. Ebenso konnte eine Synthese von Cx45 mittels Reverse Transcriptase (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR) und In-situ-Hybridisierung gezeigt werden. Es gibt also morphologische, molekularbiologische und immunhistochemische Hinweise dafür, dass die Muskelzellen der Harnblase durch gap junctions elektrisch gekoppelt sind (John H et al., 2003).

Ein besseres Verständnis der zellbiologischen Vorgänge und der Bedeutung der interzellulären Kommunikation über Zellverbindungen bei der Entstehung des Urothelkarzinoms in der menschlichen Harnblase ist wünschenswert. Die Bedeutung von Connexinen beim Urothelkarzinom wurde bisher nur an Ratten betrachtet. Ob eine Bedeutung für das Urothelkarzinom der menschlichen Harnblase besteht, ist noch unbekannt. Eine Überprüfung über das Vorliegen von Connexinen an Zellen von menschlichem Harnblasenkrebs und deren Ausprägungsintensität soll zeigen, ob dieser Nachweis beim Menschen zum Nachweis von Connexinen im Harnblasenkrebs der Ratte vergleichbar ist. Verbesserte Kenntnisse über Expressionsänderungen der Connexine bei menschlichen Harnblasenkrebs könnten einen neuen Ansatzpunkt in der Krebstherapie aufdecken. Die vorliegende Arbeit soll hierzu Informationen beisteuern.

Bevor das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Material gewonnen wurde, erfolgte ein zustimmendes Votum sowohl der Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes, als auch der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinlandpfalz [Bearbeitungsnummer 837.313.14(9552)].

Mit dem nachfolgenden Aufklärungsbogen haben die Patienten ihre Zustimmung zur Gewinnung der Gewebeproben erklärt:

D. Comberg, Urologische Praxis, Zweibrücken

Praxisstempel/Klinikstempel:

Informationsblatt und Einverständniserklärung

(unter Berücksichtigung der entsprechenden Checkliste des Arbeitskreises Medizinischer Ethik-Kommissionen in der Bundesrepublik Deutschland e.V.)

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

zur Behandlung Ihrer Erkrankung sind ärztliche Maßnahmen meinerseits nötig, in deren Verlauf unter anderem auch Gewebeproben entnommen werden müssen. Für diese wissenschaftlichen Untersuchungen bitten wir Sie um eine Gewebespende, die aus dem Operationsmaterial (das ohnehin verworfen werden würde) entnommen werden soll. Diese Gewebespende ist für Sie mit keinen zusätzlichen Risiken oder Nebenwirkungen verbunden. Sie werden keinen persönlichen Nutzen von der Gewebespende haben, die Ergebnisse dieser Untersuchung werden jedoch zum wissenschaftlichen Verständnis von Blasentumoren beitragen. Ihre Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung ist vollkommen freiwillig. Sie können jederzeit Ihr Einverständnis zur Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass Ihnen daraus Nachteile für die weitere Behandlung entstehen. Die während dieser Untersuchung gesammelten Daten werden nur in verschlüsselter Form weitergeleitet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen gegebenenfalls veröffentlicht werden. Ausführliche Informationen nach der o.g. Checkliste:

- Titel: Connexin-Expression in Tumoren der Harnblase
- Ziel: Die Studie soll Grundlagen über das Vorkommen von speziellen Eiweißen, sogenannten Connexinen, in Harnblasentumoren beschreiben. Diese Eiweiße können eine Bedeutung für das Wachstum der Tumoren haben und von Bedeutung für eine zukünftige Therapie sein. Sie bilden vermutlich Verbindungen zwischen den Tumorzellen aus und dienen der Verständigung der Zellen untereinander. Dadurch könnten sie das Tumorstadium fördern und ein Angriffspunkt für neue Medikamente sein.
- Studiendesign: Die Proben werden gesammelt und im Labor analysiert.
- Ablauf: Die Studie dauert zwei Jahre (9/2014 bis 9/2016).

- Nutzen-Risiko-Abwägung: Durch die zu gewinnenden Informationen wird ein Nutzen für die Allgemeinheit erwartet, der im besseren Verständnis der Biologie der Blasentumoren liegt. Sie haben persönlich keinen direkten Nutzen von den Ergebnissen aus der Studie.
- Informationen zu einzelnen Aspekten:
 - Es werden kleine, erbsengroße Gewebestückchen des Tumors untersucht.
 - Das Gewebe wird bei der Operation elektrochirurgisch abgetragen. Dabei können Blutungen auftreten.
 - Das Gewebe wird chemisch haltbar gemacht oder eingefroren und im Labor untersucht (Eiweißanalyse, Immunhistochemie an histologischen Präparaten).
 - Der Zweck ist die Bestimmung von sogenannten Connexin-Molekülen.
 - Das Gewebe wird verbraucht bzw. eventuelle Reste werden nach Ablauf der Studie vernichtet. Die histologischen Präparate werden entsprechend den Vorschriften zehn Jahre vorgehalten und anschließend vernichtet.
 - Das Material wird in der Anatomie der Universität des Saarlandes, Campus Homburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Tschernig, verwendet (Kirrberger Straße, 66424 Homburg/Saar).
 - Den einzelnen Proben werden Diagnose, Alter und Geschlecht des Patienten bzw. der Patientin sowie die Diagnose des Pathologen zugeordnet. Dem Labor sind kein Name und keine personenbezogenen Daten bekannt (Pseudonymisierung der Gewebeproben mittels Referenzliste).
 - Sie bekommen keine Information über die Ergebnisse des von Ihnen stammenden Materials und Sie haben keinen persönlichen Nutzen. Ihr weiterbehandelnder Arzt wird nicht über die Daten aus Ihrem Material informiert. Das Restmaterial wird vernichtet und eine kommerzielle Verwertung des Materials findet nicht statt.

- Datenschutz: Die Referenzliste zur Rückverfolgung der Patientendaten wird nach Ablauf der Studie vernichtet.
- Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und Sie können Ihre Einwilligung jederzeit zurückziehen, also von der Teilnahme zurücktreten. Bei einem Rücktritt innerhalb der Studiendauer wird Ihr Gewebe und werden Ihre Daten vernichtet.

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis zur Gewebespende in der oben beschriebenen Form. Ich kann mein Einverständnis jederzeit, formlos ohne Nachteile widerrufen. Alle Fragen zur Studie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Eine Kopie des Informationsblattes habe ich erhalten.

Datum

Patientin/Patient

Aufklärende/r
Ärztin/Arzt

4. Fragestellung

Erkenntnisse über Connexine im Gewebe von menschlichen Urothelkarzinomen liegen nach Wissen des Autors nicht vor. In der täglichen urologischen Patientenversorgung besteht eine immerwährende Herausforderung darin Karzinome der Harnblase frühzeitig zu erkennen und diese zu behandeln. Die Häufigkeit mit der der Autor beruflich mit Karzinomen der Harnblase konfrontiert ist, motivierte dazu sich auch wissenschaftlich mit Harnblasenkarzinomen zu beschäftigen.

Es stellte sich daher die Frage:

Sind Connexine im Urothelkarzinom der menschlichen Harnblase überhaupt nachweisbar und haben sie damit möglicher Weise eine Bedeutung?

Dazu sollte mithilfe von Antikörpern eine Auswahl von Connexinen immunhistochemisch untersucht werden. Die Auswahl bezieht sich auf die Connexine Cx26, Cx29, Cx32, Cx33, Cx36 und Cx43. In der Morphologie der Harnblasenwand finden sich verschiedene Kompartimente. Dem Harnblasenlumen ist die Schleimhaut (das Urothel) zugewandt. Sie liegt der Lamina propria auf. Darunter findet sich die Submukosa und daran anschliessend die Muskularis mit einer inneren und einer äusseren Schicht. Den Abschluss bildet die Adventitia.

Die immunhistochemische Nachweisform wurde gewählt, um im Falle eines positiven Nachweises von Connexinen diese auch eindeutig dem entsprechenden Kompartiment zuordnen zu können.

5. Material und Methodik

Es wurde Gewebe von Karzinomen in der Harnblase untersucht. Die Patienten beiderlei Geschlechts, von denen das Untersuchungsmaterial gewonnen wurde, litten an den Karzinomen und eine operative Sanierung war erforderlich. Während der therapeutischen Maßnahme, einer transurethralen Elektroresektion der Harnblase, wurde je eine repräsentative Probe für diese Untersuchung in gepuffertem 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2 asserviert. Eine transurethrale Elektroresektion der Harnblase ist ein operativer Eingriff, bei dem unter Sicht durch ein durch die Harnröhre bis in die Harnblase eingeführtes Instrument Gewebe entfernt wird. Einschlusskriterium war das bekannte Karzinomleiden. Patienten, deren Karzinomdiagnose noch zweifelhaft war, wurden ausgeschlossen. Das Untersuchungsmaterial wurde in verschiedenen Kliniken gewonnen. Für die Einteilung der Tumore wurde von den beurteilenden Pathologen die TNM-Klassifikation in der Fassung von 2004 der S3-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Urologie angewendet. Da finden sich folgende Bezeichnungen für die Tumorausbreitung: Tx = der Tumor kann nicht beurteilt werden, T0 = kein Anhalt für einen Primärtumor, Ta = nicht invasiver papillärer Tumor, TIS = Carcinoma in situ, T1 = der Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe, T2 = der Tumor infiltriert die Muskulatur, T2a = der Tumor infiltriert die oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte), T2b = der Tumor infiltriert die äussere Muskulatur (äussere Hälfte), T3 = der Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe, T3a = mikroskopisch extravesikaler Tumor, T3b = makroskopisch extravesikaler Tumor, T4 = der Tumor infiltriert die Prostata, den Uterus, die Vagina oder die Becken-/Bauchwand, wobei unterschieden wird in T4a = der Tumor infiltriert die Prostata, den Uterus oder die Vagina und in T4b = der Tumor infiltriert

die Becken- oder Bauchwand. Anhand der rein transurethral gewonnenen Gewebeproben kann keine Aussage zum Lymphknoten- oder Metastasierungsstatus getroffen werden. Das nachfolgende Schaubild verdeutlicht die Klassifizierung der Tumore nach dem Befall der verschiedenen Schichten der Blasenwand.

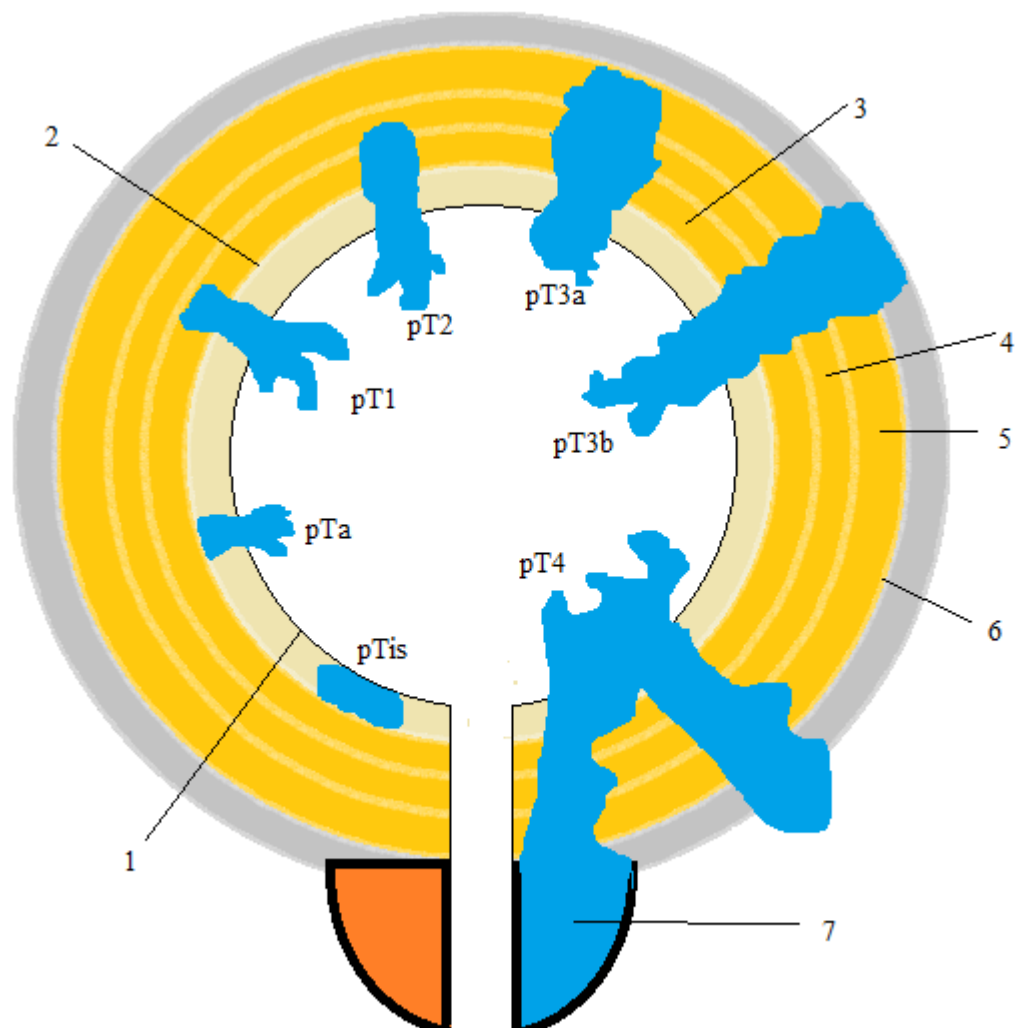


Abbildung 6: modifiziert nach Jocham D, 2007. Gezeigt werden die Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms (gemäß TNM-Klassifikation der UICC von 1997 bzw. 2003). Etwa 2/3 der Urothelkarzinome wachsen oberflächlich, T2 erreicht die Muskelschicht, T3 überschreitet die Blasenwand. 1 = Schleimhaut, 2 = Lamina propria, 3 = Submukosa, 4 = Muskularis, innere Schicht, 5 = Muskularis äußere Schicht, 6 = Adventitia, 7 = Prostata

Die TNM-Klassifikation in der Fassung von 2004 der S3-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Urologie beschreibt zum histopathologischen Grading: G1 = Papilläre hochdifferenzierte Tumore, G2 = Tumore bei denen es zu einer Textur- oder einer Schichtungsstörung des Urothels kommt, aber dennoch eine deutliche zytologische Übereinstimmung zu normalem Urothel erkennbar ist. G3 = Tumore bei denen eine weitere Schichtungsstörung hinzutritt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Gesamtübersicht der Probennummern, des Geschlechts, des Alters, der gefundenen Karzinomart, das Ausmass der Tumorinvasion und des gefundenen Gradings im untersuchten Kollektiv.

Probennummer	Geschlecht	Alter	Karzinomart	Tumorinvasion	Tumorgrading
5	M	71	Urothel	pT2	G3
6	M	71	Urothel+Neuroendokrin	pT3a, pTis	G3
8	W	84	Urothel	pT2	G3
9	W	83	Urothel	pT2	G3
10	W	73	Urothel	pTa	G1-2
11	M	75	Urothel	pT2, pTis	G3
12	M	64	Urothel	pTa	G2
13	M	91	Urothel	pT2, pTis	G3
14	W	46	Urothel	pTa	G2

Tabelle 1: Gesamtübersicht über das untersuchte Patientenkollektiv

Die Informationen aus der voranstehenden Tabelle sind zur schnellen Übersicht nochmals graphisch aufgeteilt. So lag die Verteilung der Geschlechter bei 5 Männern und 4 Frauen.

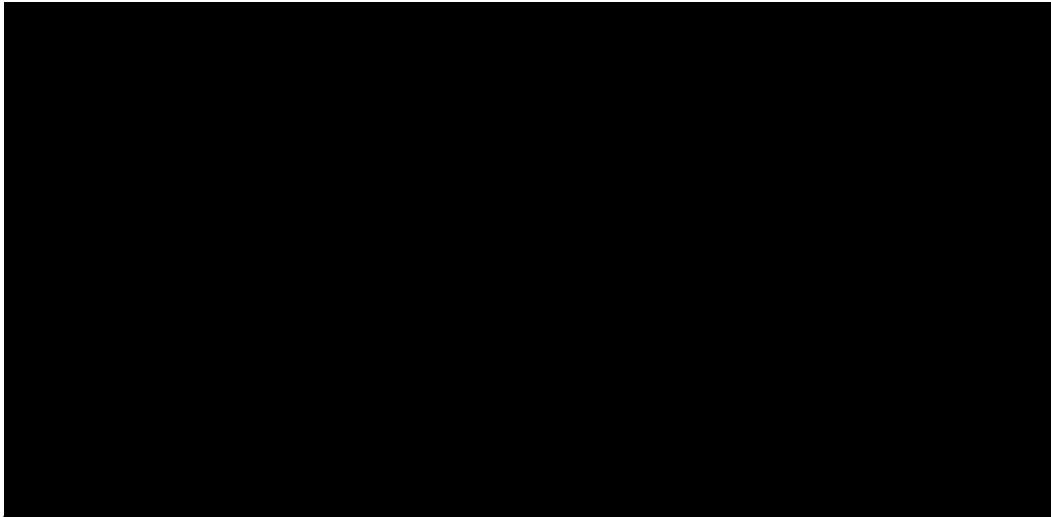


Abbildung 2: Es ist die Aufteilung des Patientenkollektiv nach Geschlechtern gezeigt: Von insgesamt 9 eingeschlossenen Proben waren 4 Probanden weiblich, 5 männlich.

Das Alter der Probanden verteilt sich wie die folgende Graphik zeigt:

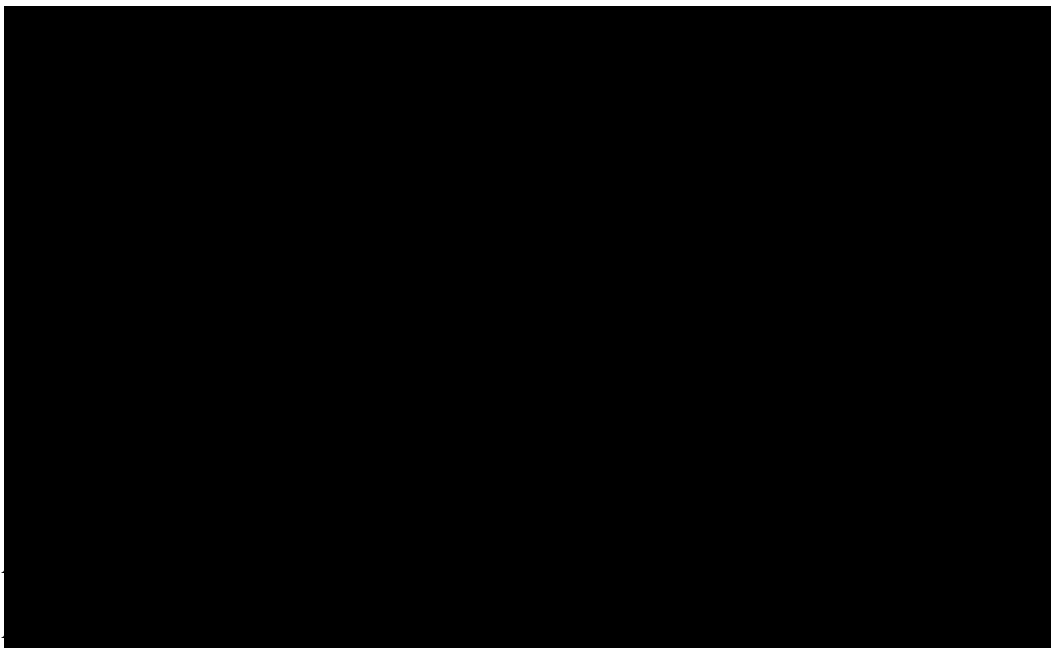


Abbildung 3: Gezeigt ist das Alter der Probanden nach Geschlecht

Das durchschnittliche Alter der Frauen lag bei 71,5 Jahren bei einer Altersverteilung von 46 Jahren bis 84 Jahren. Das durchschnittliche Alter der Männer lag bei 74,4 Jahren, der jüngste war 64 Jahre, der älteste 91 Jahre alt. Das durchschnittliche Alter aller Probanden lag bei 73,1 Jahren.

In Bezug auf die Tumorinvasion fand sich folgende Verteilung:

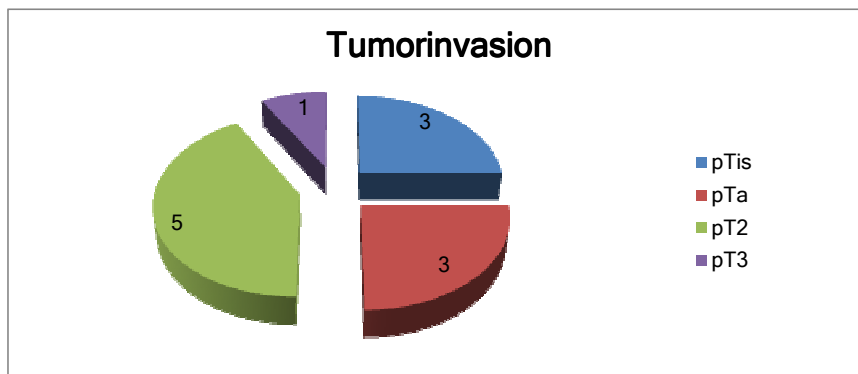


Abbildung 4: Gezeigt wird die Häufigkeit der aufgetretenen Tumorinvasionen

Die Stadien der Tumorinvasion waren verteilt auf 3 x pTis, 3 x pTa, 5 x pT2, 1 x pT3. Bei 3 Patienten lagen 2 unterschiedliche Tumore parallel vor mit unterschiedlichen Stadien der Tumorinvasion.

In Bezug auf das Tumorgrading fand sich folgende Verteilung:

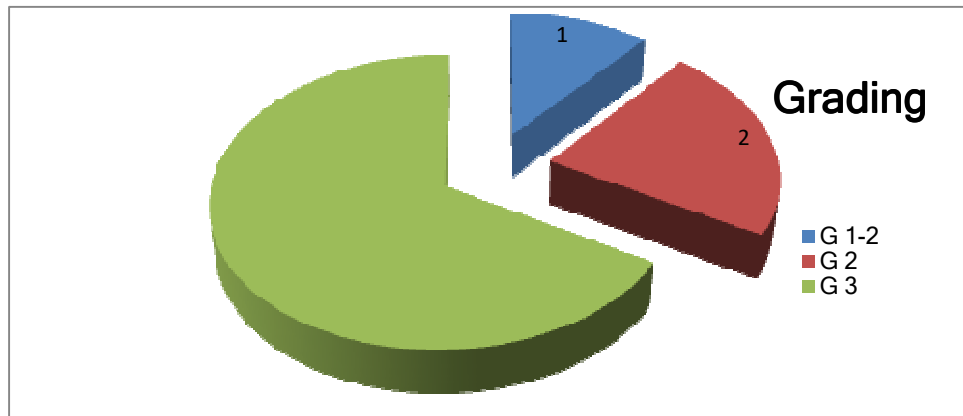


Abbildung 5: Es wird die Häufigkeit der Grade der Entartung gezeigt

Im Grading lag 1 Karzinom bei G1-2, 2 bei G2 und 6 Karzinome bei G3.

In der immunhistologischen Aufarbeitung wurden die Resektate in gepuffertem, vierprozentigen Formaldehyd fixiert und bis zur Verwendung bei 4 Grad Celsius aufbewahrt. Alle Gewebeproben wurden mit Routinemethoden gespült, entwässert und in Paraffin eingebettet (Gewebeeinbeter MTP, SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland). Von den Blöcken wurden 5 µm dicke Schnitte (Rotationsmikrotom Historange 2218, LKB) angefertigt und auf Objektträgern montiert. Von jeder Probe wurden Schnitte HE gefärbt, um eine zweite Bewertung der histopathologischen Diagnose zu ermöglichen. Weitere Schnitte wurden nach dem Trocknen mit Xylol entparaffiniert. Eine absteigende Alkoholreihe diente zum Überführen ins wässrige Milieu, da die Farbstoffe und Antikörper wässrig gelöst vorliegen. Danach wurde der verdünnte Antikörper (Tabelle 2) aufgetragen und über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper mit einer

Pufferlösung abgewaschen und mit einem HRP (horse raddish peroxidase = Meerrettich-Peroxidase)-konjugierten Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen HRP, Verdünnung 1:500, Invitrogen A10547) inkubiert. Der gegebenenfalls am Gewebe gebundene Antikörper wurde durch ein Nachweis-Kit (DAB Enhanced Liquid Substrate System for Immunohistochemistry, SIGMA Product No. D 3939) dargestellt. Dabei wurde die Diamino-Benzidin-Peroxidase-Methode verwendet, in dem ein bräunlicher Niederschlag anzeigt, wo der Primärantikörper gebunden ist. Nun erfolgte eine zweite histopathologische Beurteilung durch den Pathologen Dr. A. Gauer, Kaiserslautern. Die immunhistochemischen Färbungen wurden getrennt vom Autor, vom Betreuer der Arbeit, Prof. T. Tschernig und wieder von Dr. A. Gauer lichtmikroskopisch ausgewertet. Repräsentative Präparate wurden fotografiert (Mikroskop ZEISS Axiophot, Kamera Olympus Color View II, Software Olympus cellSens Standard). Für jeden Connexin-Antikörper wurden mindestens 6 Schnitte hergestellt und ausgewertet. In der nachfolgenden Tabelle wird die Herkunft der verwendeten Antikörper und Reagenzien dargestellt:

Connexin	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Cat. No.
Cx26	Kaninchen	1:50	life technologies	51-2800
Cx29	Kaninchen	1:100	Zymed	34-4200
Cx32	Kaninchen	1:100	Invitrogen	34-5700
Cx33	Kaninchen	1:100	Alpha diagnostic Inc.	
Cx36	Kaninchen	1:100	Zymed	51603
Cx43	Kaninchen	1:50	Abcam	ab11370

Tabelle 2: Herkunft und Verwendung der zur Connexin-Färbung verwendeten Antikörper und Reagenzien. Alle Connexin-Antikörper sind polykonal aus Kaninchen. Der bei allen Connexin-Antikörpern verwendete Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper ist im Text aufgeführt.

6. Ergebnisse

An allen Proben wurden Färbungen der Connexine 26, 29, 32, 36 und 43 durchgeführt. Als Nachweis für die Funktion und Spezifität der Antikörper wurden Schnitte von Mausorganen, Stamm C57BL/6, (Herz, Leber und Gehirn) mit den Antikörpern gefärbt. In Abbildung 7 wird exemplarisch eine Färbung gegen Connexin 43 am Herzmuskel der Maus gezeigt. 1 cm im Bild entsprechen 15 μm im Präparat. Durch die Gegenfärbung sind die Zellkerne schwach blau gefärbt. Das immunhistochemische, spezifische Reaktionsprodukt stellt sich braun (DAB) dar.

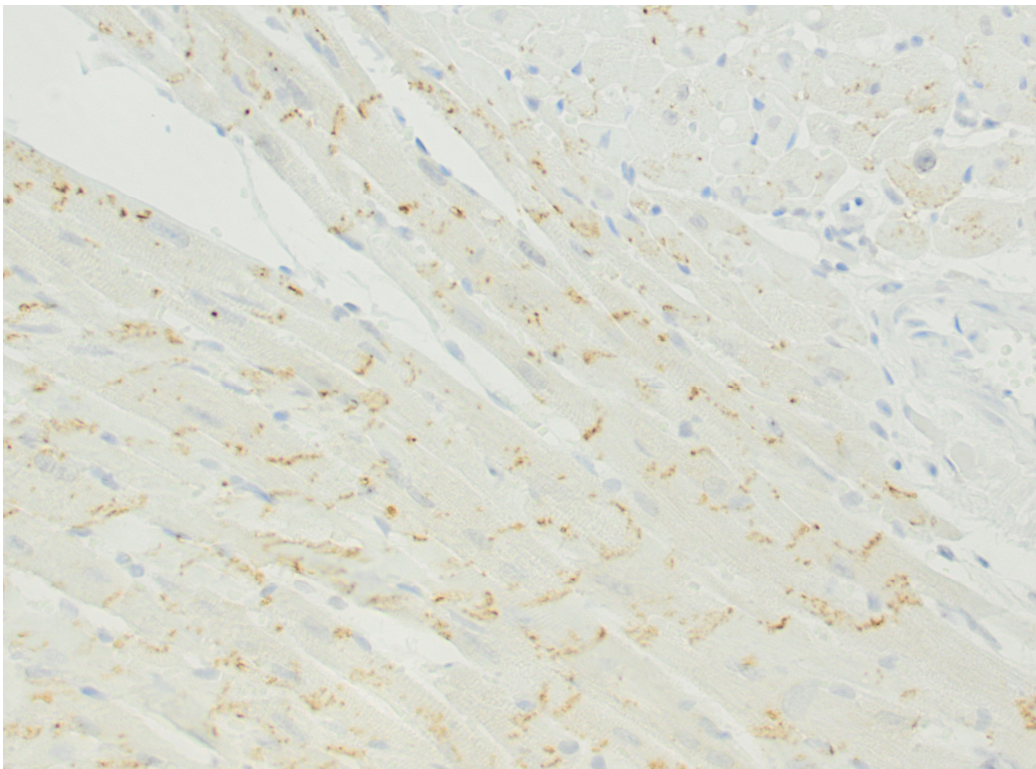


Abbildung 7: Färbung gegen Connexin 43 am Herzmuskel der Maus, 1cm im Bild entsprechen 15 μm im Präparat. Es ist eine deutliche, spezifische Anfärbung der Disci intercalares (Glanzstreifen) zu sehen. Diese enthalten Gap junctions zur Erregungsweiterleitung, die wiederum Connexin 43 Proteine enthalten. Die Zellkerne stellen sich blau dar.

Die Negativkontrollen ohne Verwendung des Primärantikörpers zeigten keine Anfärbung. Das Gesamtergebnis ist in Abbildung 8 zusammengefasst. Die Connexine Cx29, Cx32 und Cx36 konnten in keinem der untersuchten Urothelkarzinome nachgewiesen werden. Dagegen wurde Cx26 in zwei der neun Urothelkarzinome und Cx43 in acht der neun Urothelkarzinome gefunden. Abbildung 8 zeigt die prozentuale Verteilung der positiven Anfärbungen der einzelnen Connexine.

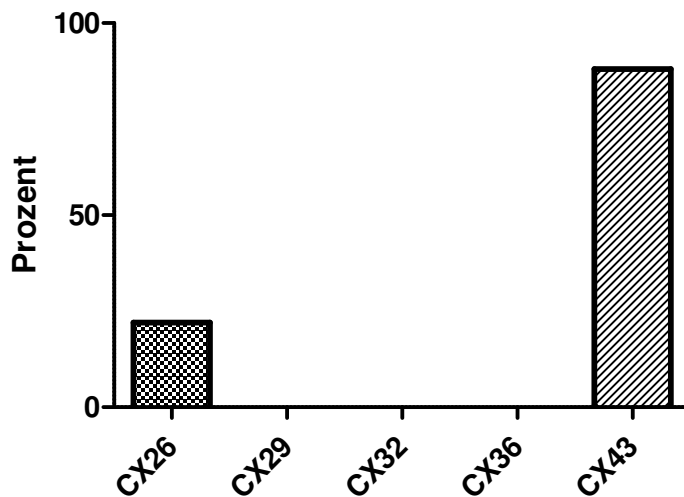


Abbildung 8: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Urothelkarzinome, in denen jeweils die Connexine Cx26, Cx29, Cx32, Cx36 und Cx43 nachgewiesen wurden.

Im Folgenden werden die Patientenfälle mit den dazugehörigen Ergebnissen ausführlich vorgestellt.

6.1 Erster Patient

72 Jahre alter Mann, Tumorstadium pT2, G3, im histologisch-pathologischen Befund: "Ausgedehnte Infiltration durch ein gering differenziertes solides Urothelkarzinom (G3) mit Infiltration der spärlich getroffenen Detrusormuskulatur, mindestens einem Tumorstadium pT2 entsprechend."

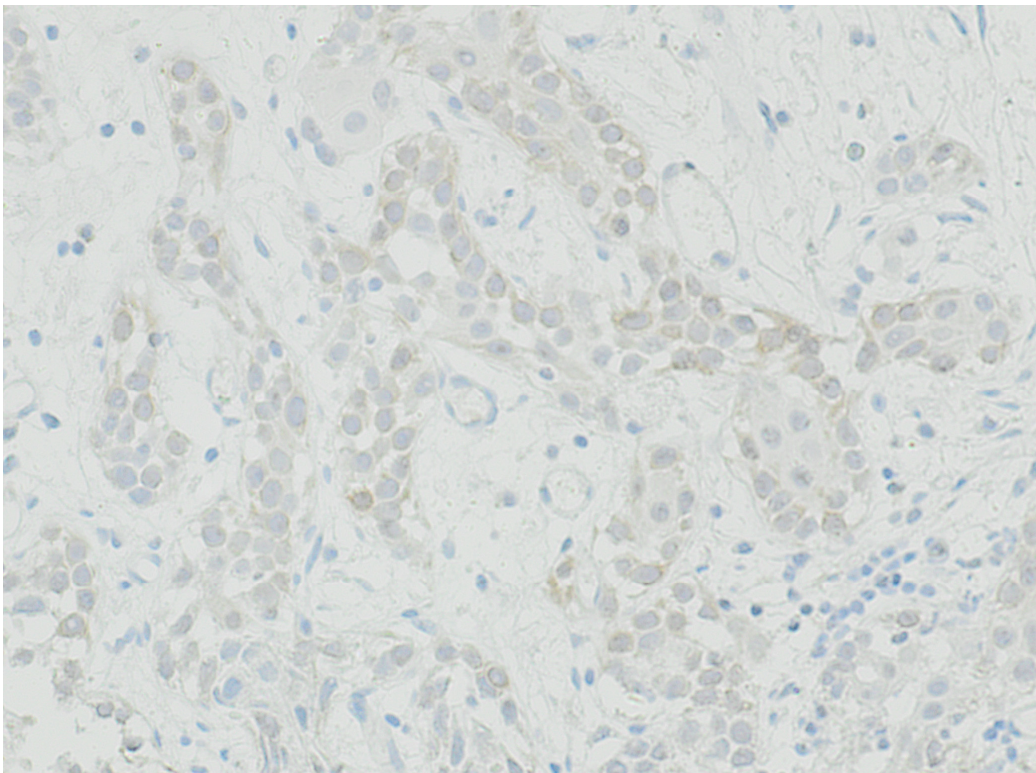


Abbildung 9: Patient 1, immunhistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

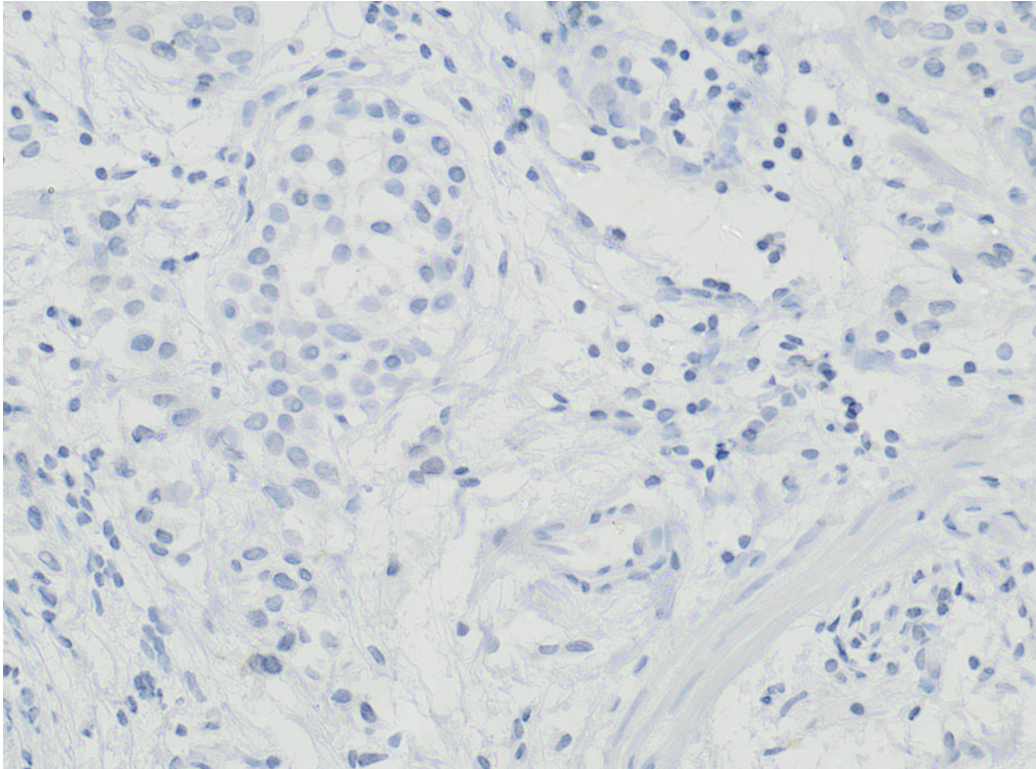


Abbildung 10: Patient 1, immunhistochemische Färbung des Connexin 29 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx29 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

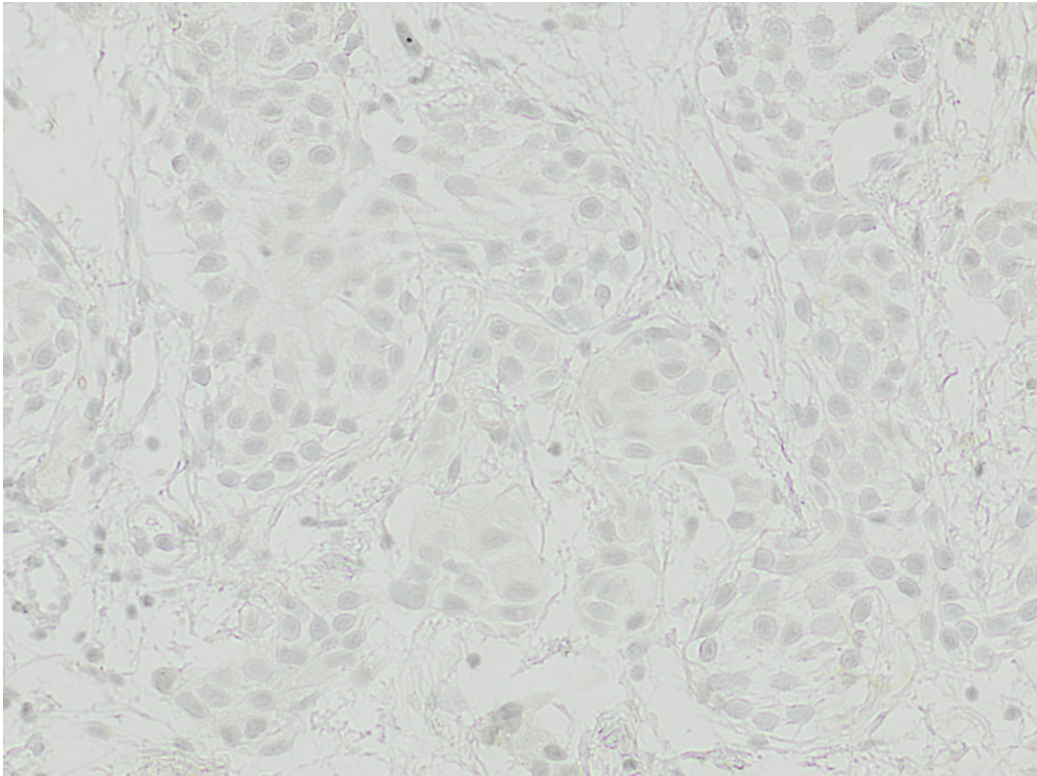


Abbildung 11: Patient 1, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx32 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

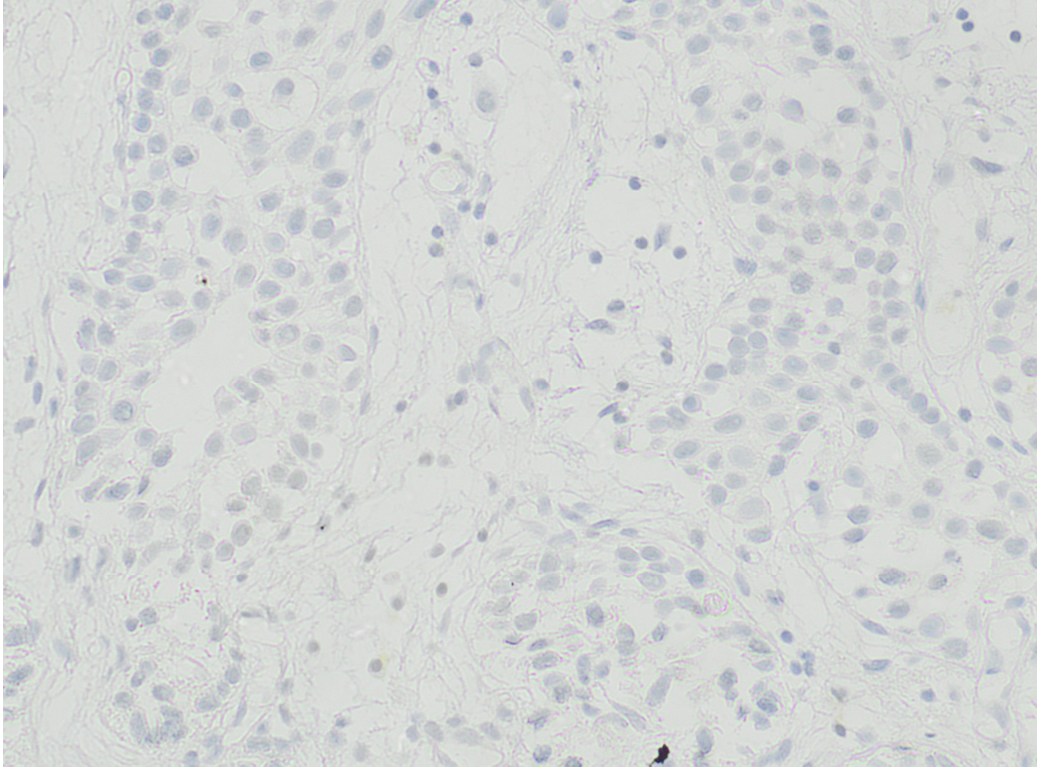


Abbildung 12: Patient 1, immunhistochemische Färbung des Connexin 36 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx36 zu erkennen. Teilweise ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

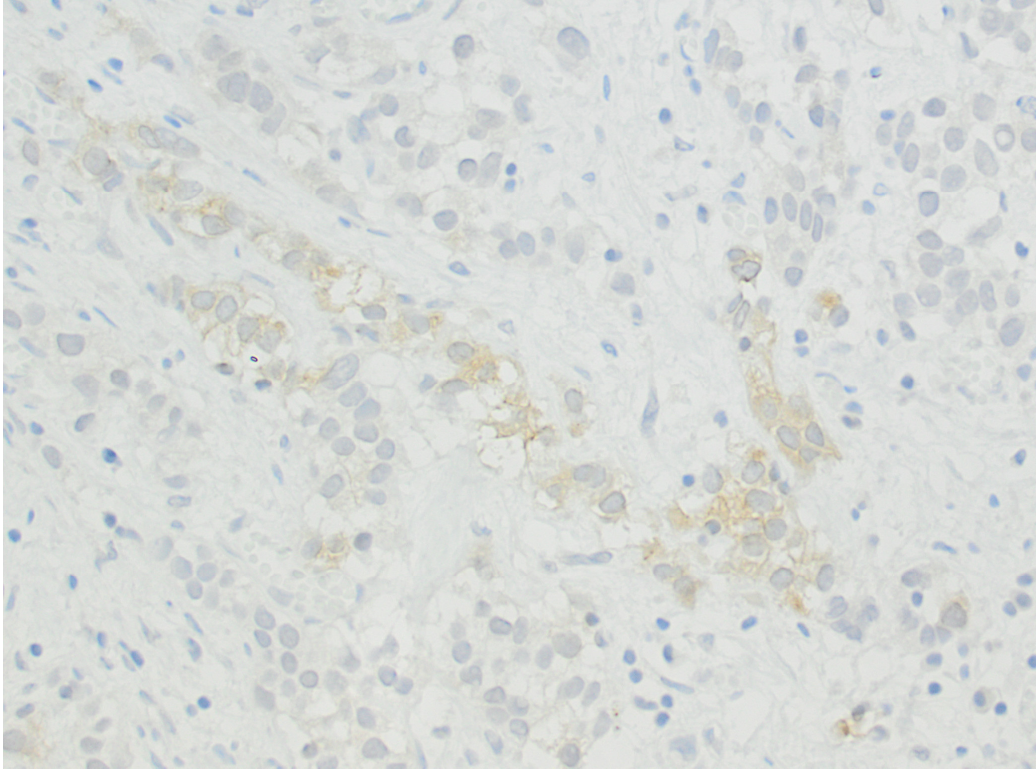


Abbildung 13: Patient 1, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich sowohl im Endothel als auch hauptsächlich im Tumorgewebe. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine deutliche, spezifische Anfärbung von Cx43 zu erkennen.

6.2 Zweiter Patient

72 Jahre alter Mann, Tumorstadium pT3a, G3 + pTis, im histologisch-pathologischen Befund: "Anteile eines großzelligen neuroendokrinen niedrig differenzierten invasiven soliden Karzinoms (G3) mit ausgedehnten Tumornekrosen und herdförmiger Infiltration bis in das miterfasste perivesikale Fettbindegewebe und spärliche Anteile eines urothelialen Carcinoma in situ."

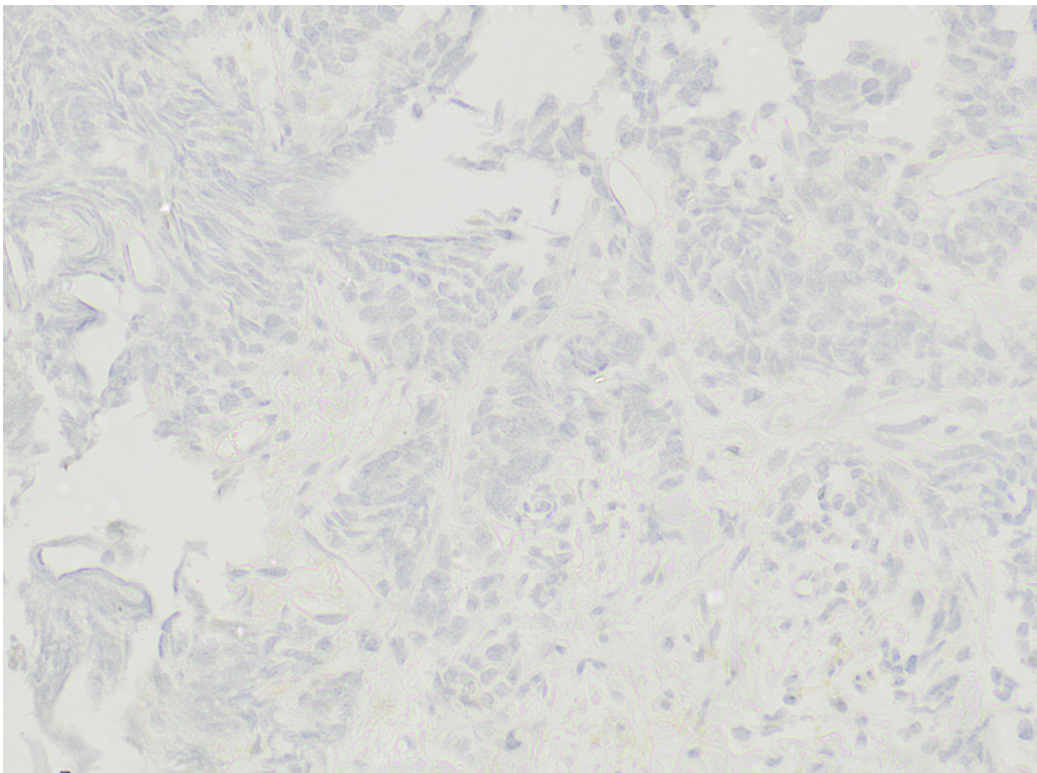


Abbildung 14: Patient 2, immunohistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der

Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

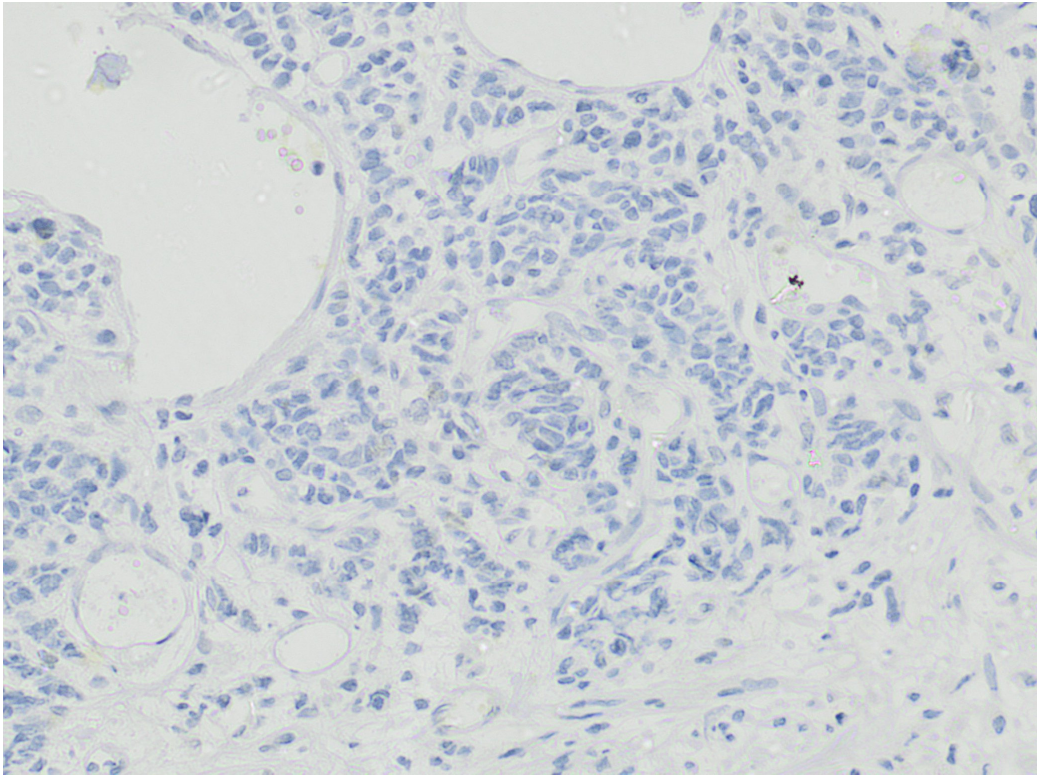


Abbildung 15: Patient 2, immunhistochemische Färbung des Connexin 29 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx29 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

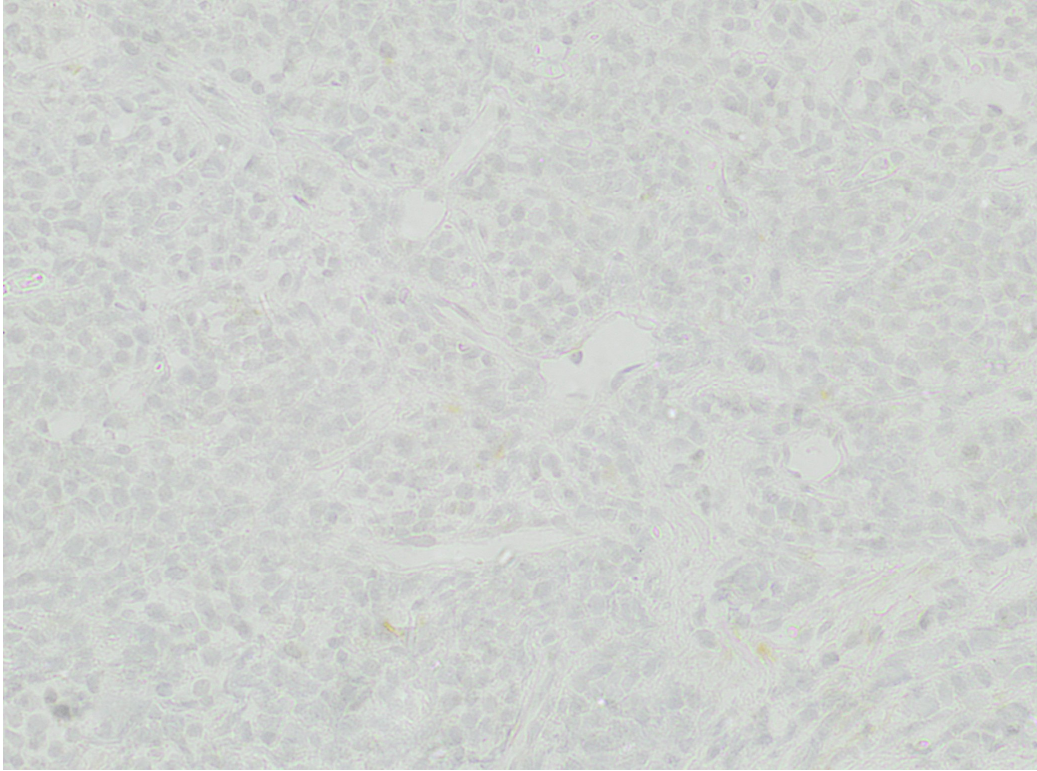


Abbildung 16: Patient 2, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx32 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

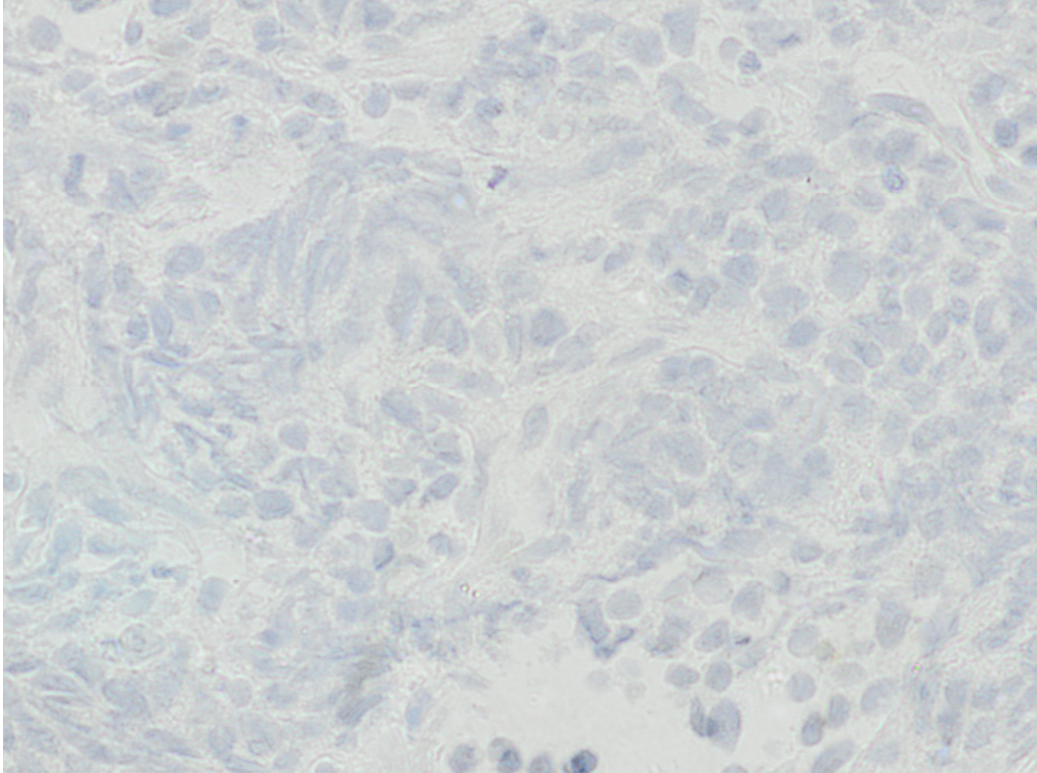


Abbildung 17: Patient 2, immunhistochemische Färbung des Connexin 36 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx36 zu erkennen. Teilweise ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden

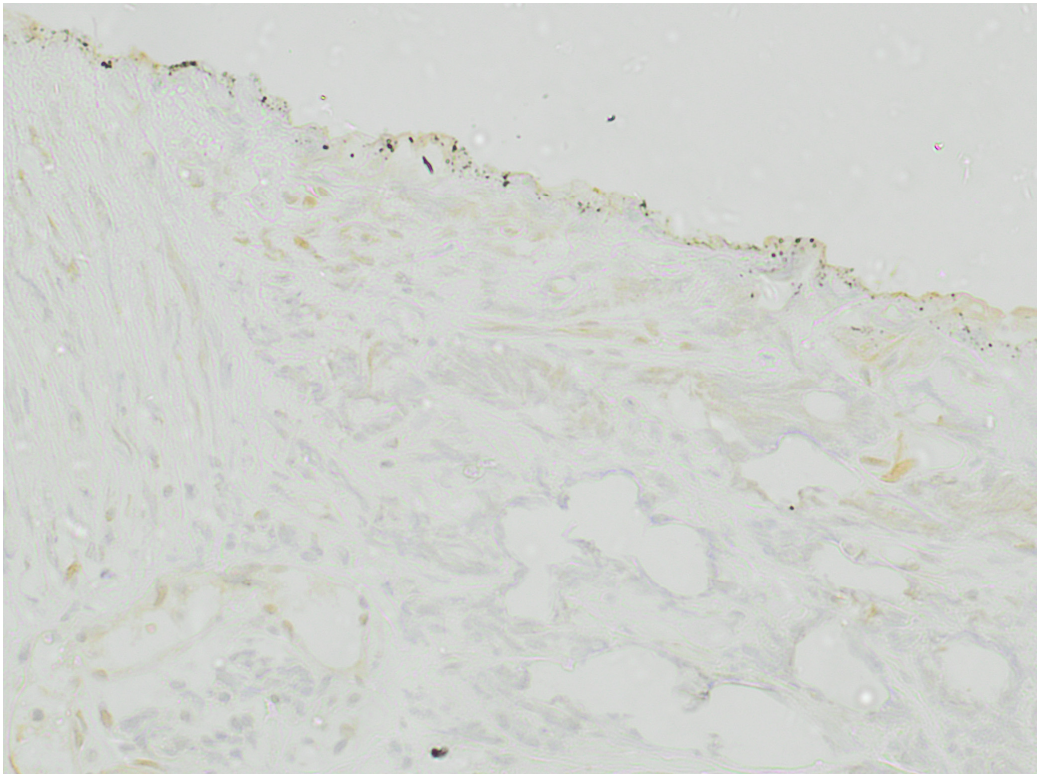


Abbildung 18: Patient 2, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich sowohl in einzelnen Tumorzellen, im Endothel als auch in neuroendokrinem Gewebe. In der Wandmuskulatur der Gefäße erscheinen auch Fibroblasten möglicher Weise angefärbt. Die Zellkerne stellen sich in einem blassen Blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine deutliche spezifische Anfärbung von Cx43 zu erkennen.

6.3 Dritter Patient

83 Jahre alte Frau, Tumorstadium pT2, G3, im histologisch-pathologischen Befund: "Gering differenziertes Urothelkarzinom (G3) mit Infiltration der Detrusormuskulatur. Fokal schwere chronische lymphoplasmahistiozytäre und lymphofollikuläre Urozystitis."

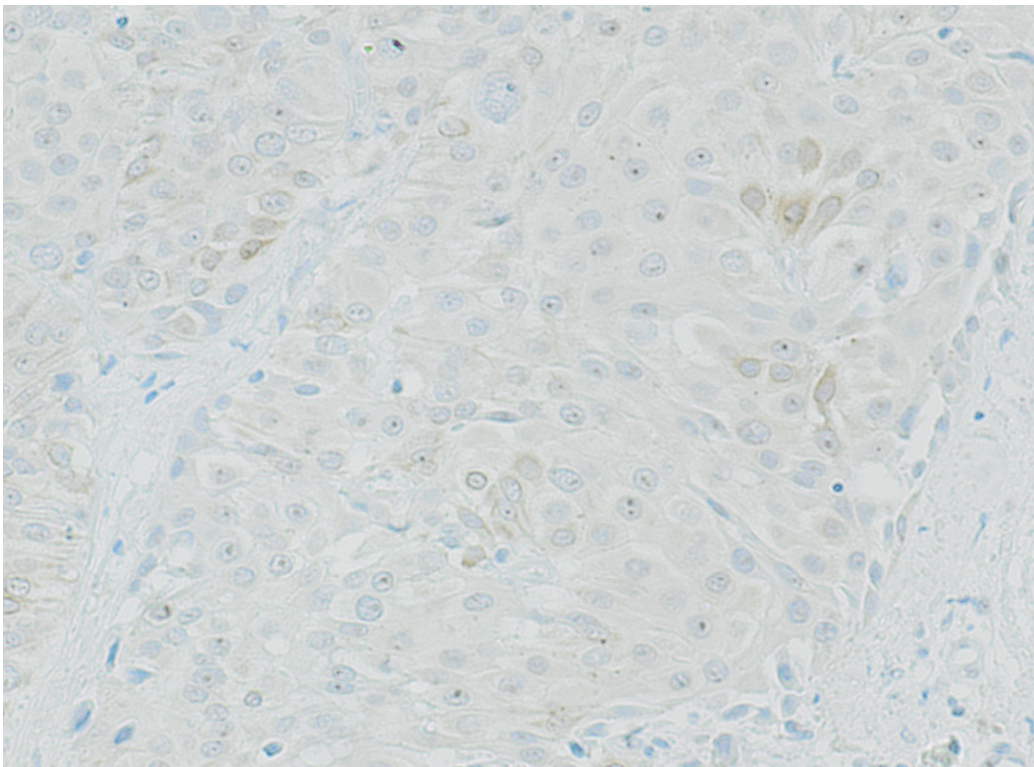


Abbildung 19: Patient 3, immunhistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Es findet sich eine schwache Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag in den Tumorzellen. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine schwache Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Diese wird als spezifisches Reaktionsprodukt gewertet. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird.

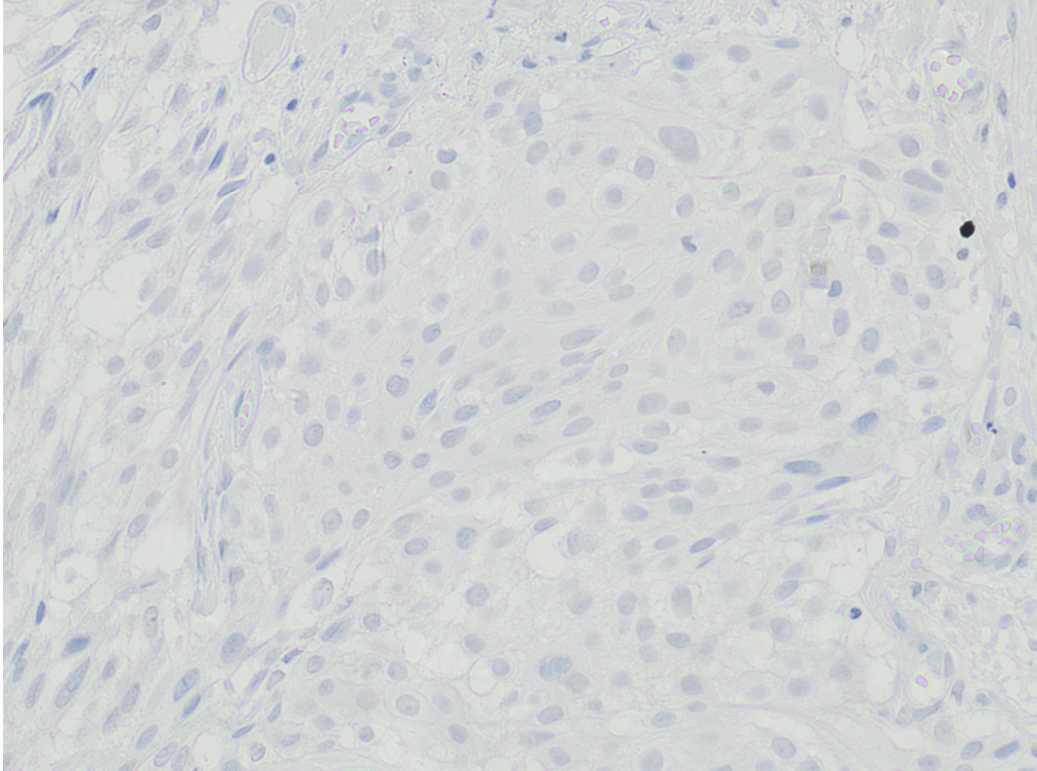


Abbildung 20: Patient 3, immunhistochemische Färbung des Connexin 29 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx29 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden

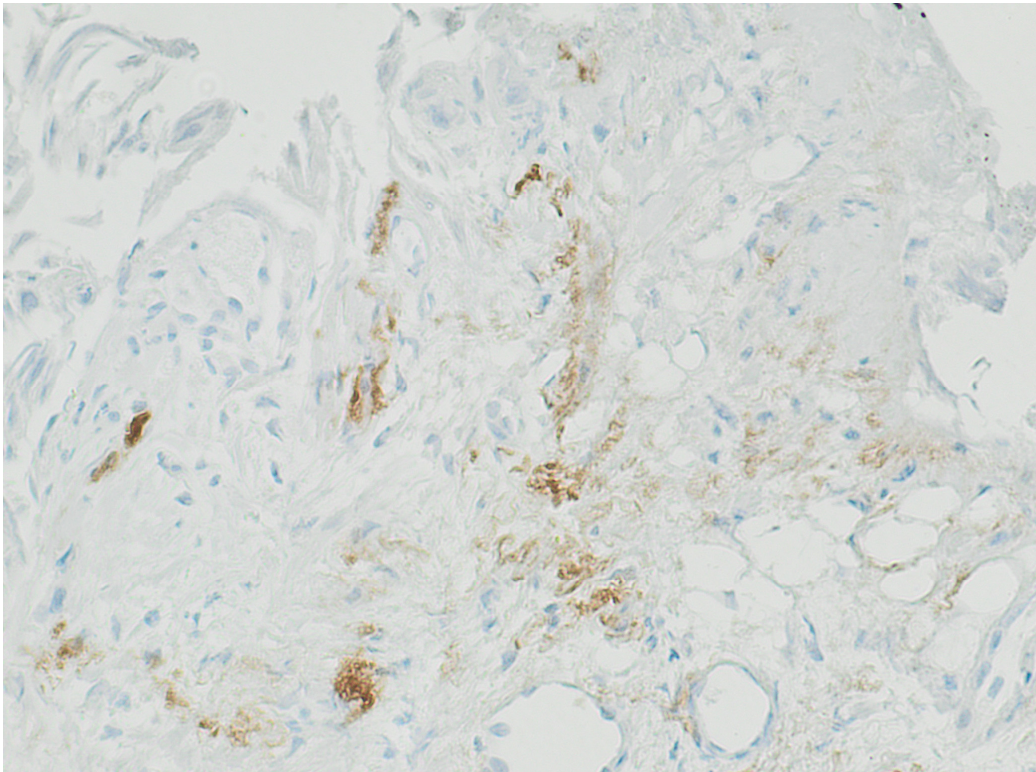


Abbildung 21: Patient 3, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Es findet sich zwar eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag, die gefärbten Strukturen gehören aber zu Gefäßen. Tumorzellen sind nicht gefärbt. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx32 im Tumor zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein tumorspezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

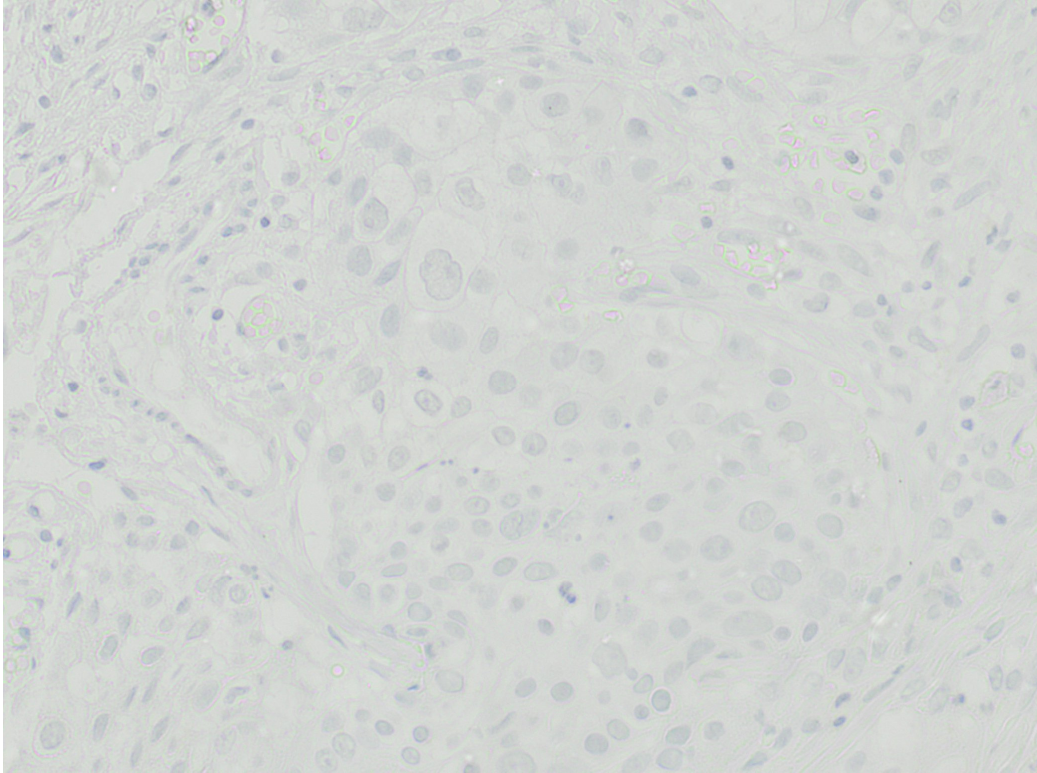


Abbildung 22: Patient 3, immunhistochemische Färbung des Connexin 36 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx36 zu erkennen. Teilweise ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden

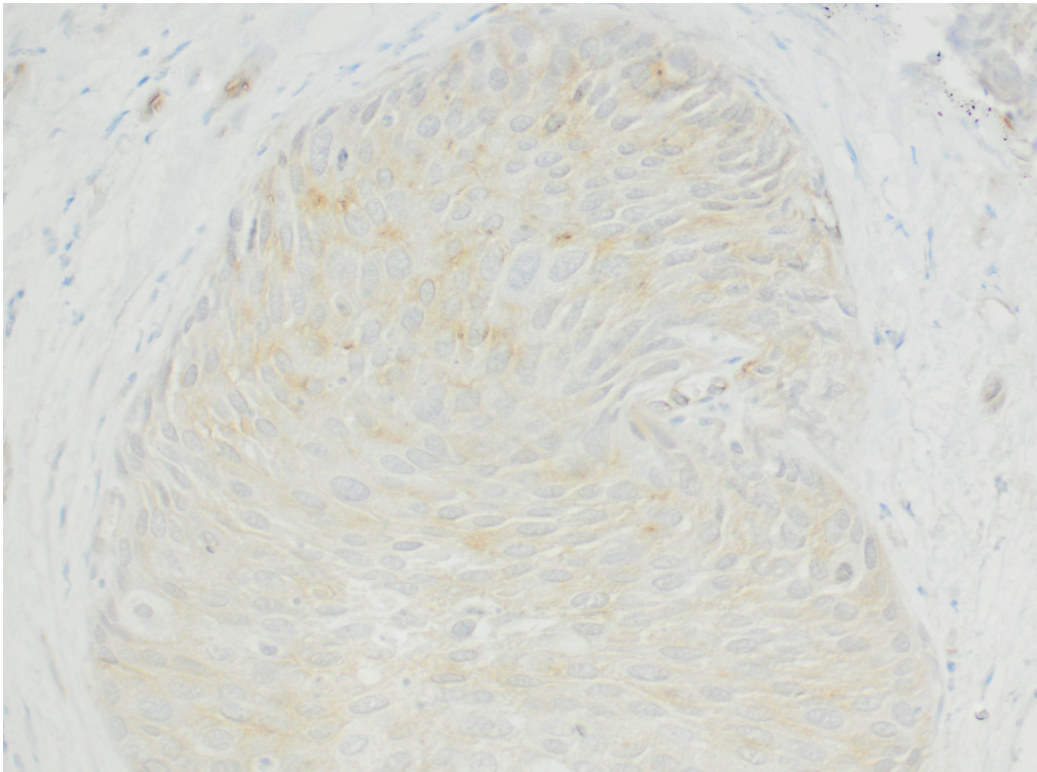


Abbildung 23: Patient 3, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich im Tumorgewebe. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μm im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine deutliche spezifische Anfärbung von Tumorgewebe mit Cx43 zu erkennen

6.4 Vierter Patient

82 Jahre alte Frau, Tumorstadium pT2a, G3, im histologisch-pathologischen Befund: "Anteile eines gering differenzierten soliden Urothelkarzinoms G3 mit Infiltration der spärlich mitgetroffenen Detrusormuskulatur."

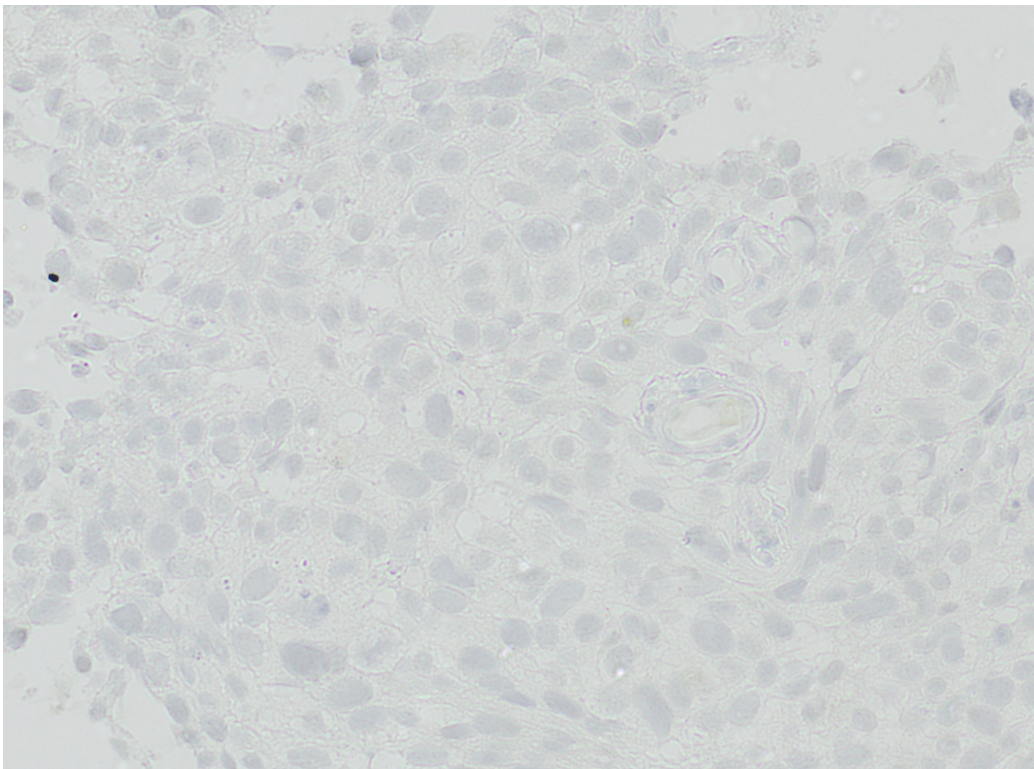


Abbildung 24: Patient 4, immunhistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

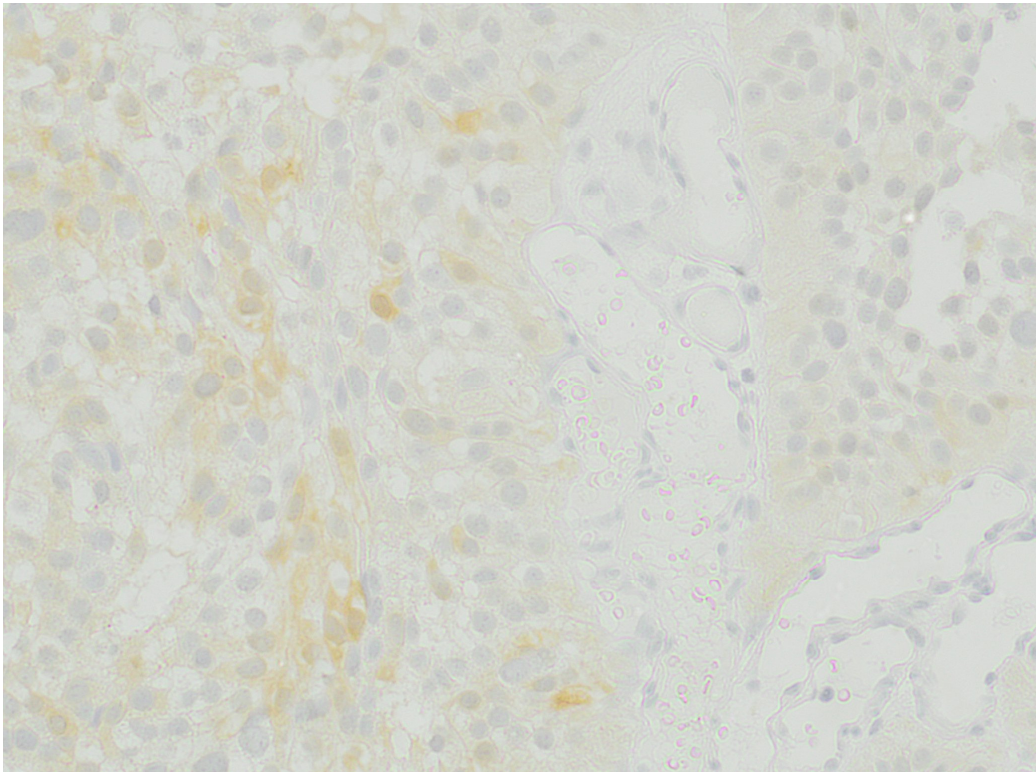


Abbildung 25: Patient 4, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich im Bindegewebe und der Muskulatur. Die Tumorzellen zeigen keinen bräunlichen Substratniederschlag. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine tumorspezifische Anfärbung von Cx32 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein tumorspezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

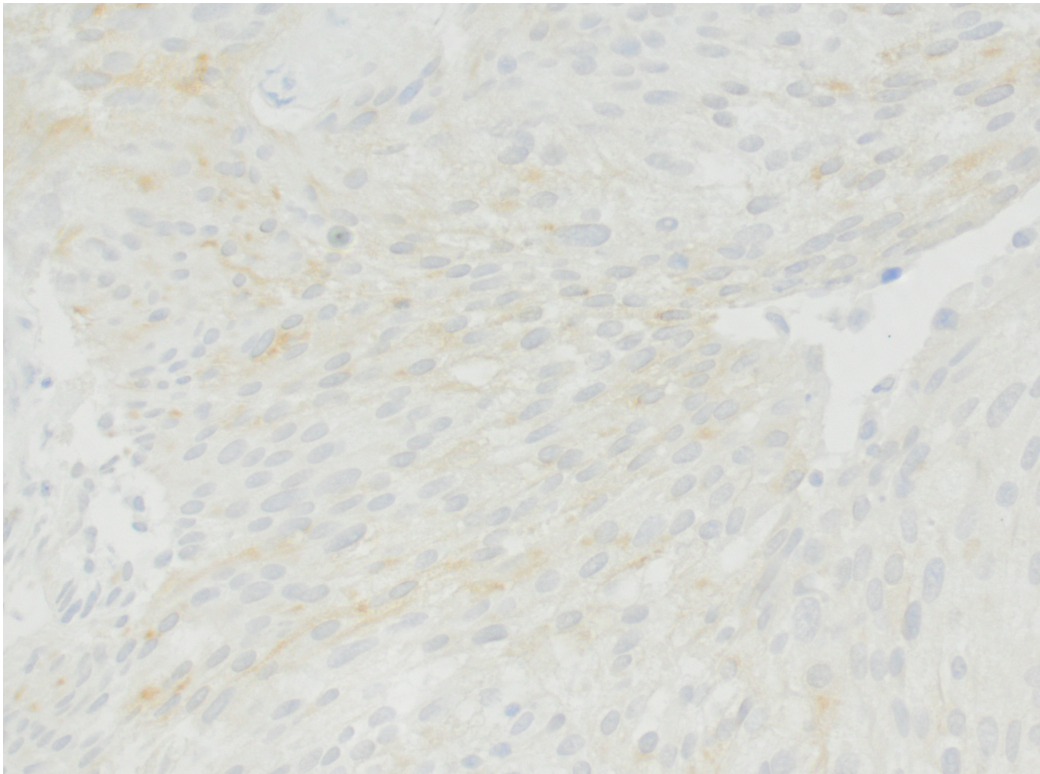


Abbildung 26: Patient 4, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich sowohl im Endothel als auch hauptsächlich im Tumorgewebe. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine deutliche spezifische Anfärbung von Cx43 zu erkennen.

Auf eine Abbildung der Präparate mit den immunhistochemischen Färbungen des Connexin 29 und des Connexin 36 beim vierten Patienten wurde verzichtet, da die Färbungen keinen bräunlichen Farbniederschlag zeigten und somit negativ waren.

6.5 Fünfter Patient

73 Jahre alte Frau, Tumorstadium pTa, G1-2, im histologisch-pathologischen Befund: "Anteile eines nicht-invasiven papillären Urothelkarzinoms (G 1-2) und etwas miterfasste tumorfreie glatte Harnblasenmuskulatur."

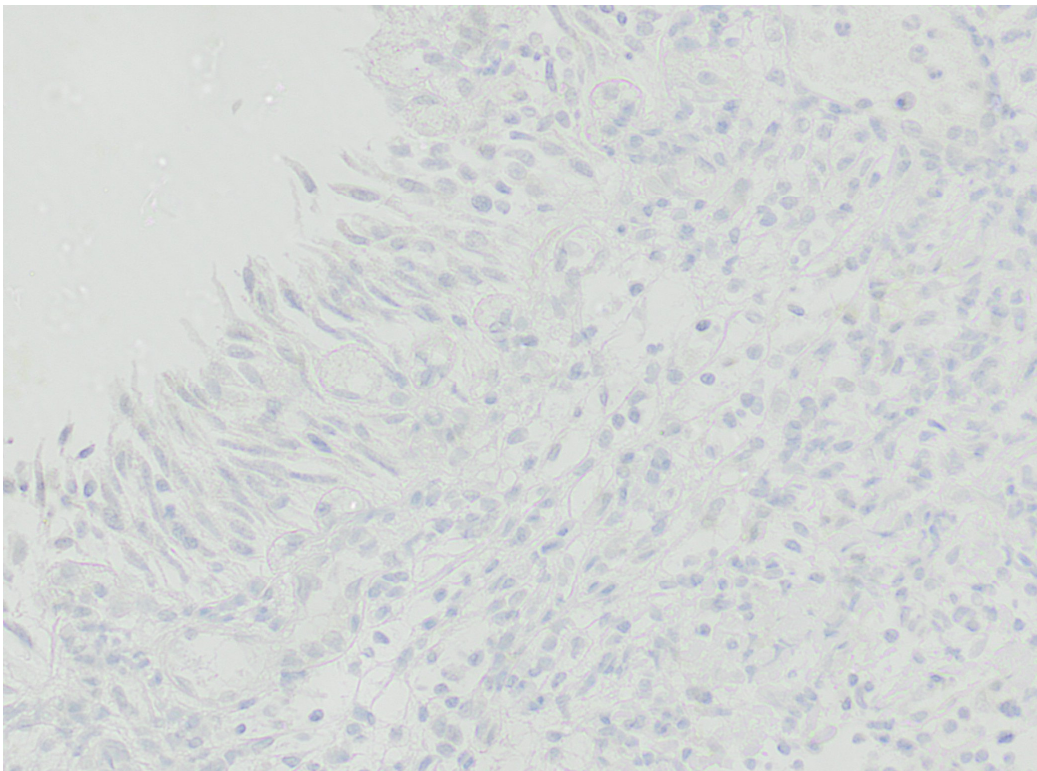


Abbildung 27: Patient 5, immunhistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

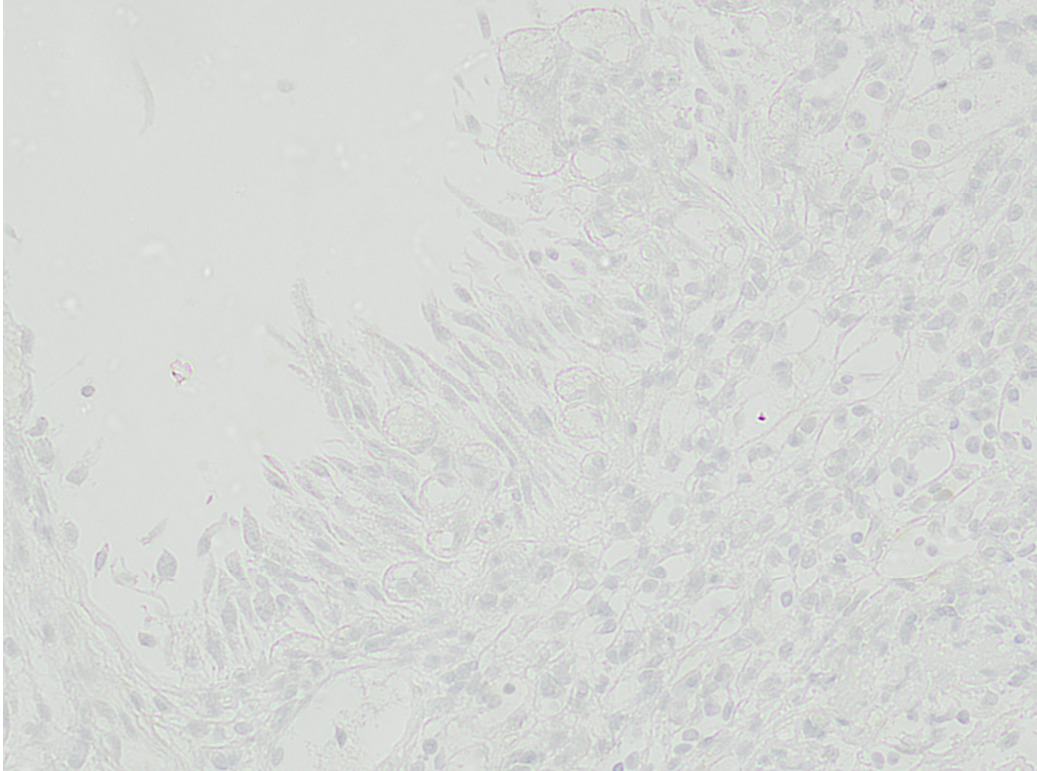


Abbildung 28: Patient 5, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx32 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

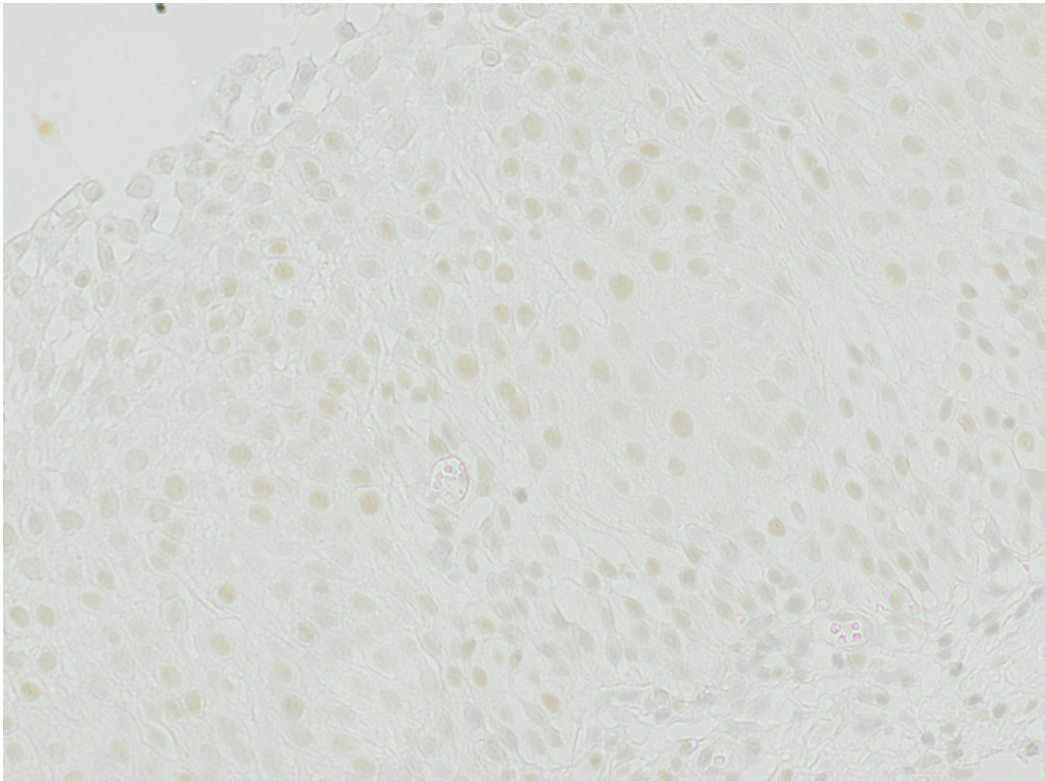


Abbildung 43: Patient 5, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich sowohl im Endothel als auch hauptsächlich im Tumorgewebe. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine deutliche spezifische Anfärbung von Cx43 zu erkennen.

Auf eine Abbildung der Präparate mit den immunhistochemischen Färbungen des Connexin 29 und des Connexin 36 beim fünften Patienten wurde verzichtet, da die Färbungen keinen bräunlichen Farbniederschlag zeigten und somit negativ waren.

6.6 Sechster Patient

75 Jahre alter Mann, Tumorstadium pT2a, G3, im histologisch-pathologischen Befund: "Anteile eines niedrig differenzierten teils papillären Urothelkarzinoms mit Infiltration der glatten Harnblasenmuskulatur (G3) und geringen Anteilen eines urothelialen Carcinoma in situ sowie ausgedehnte Tumornekrosen."

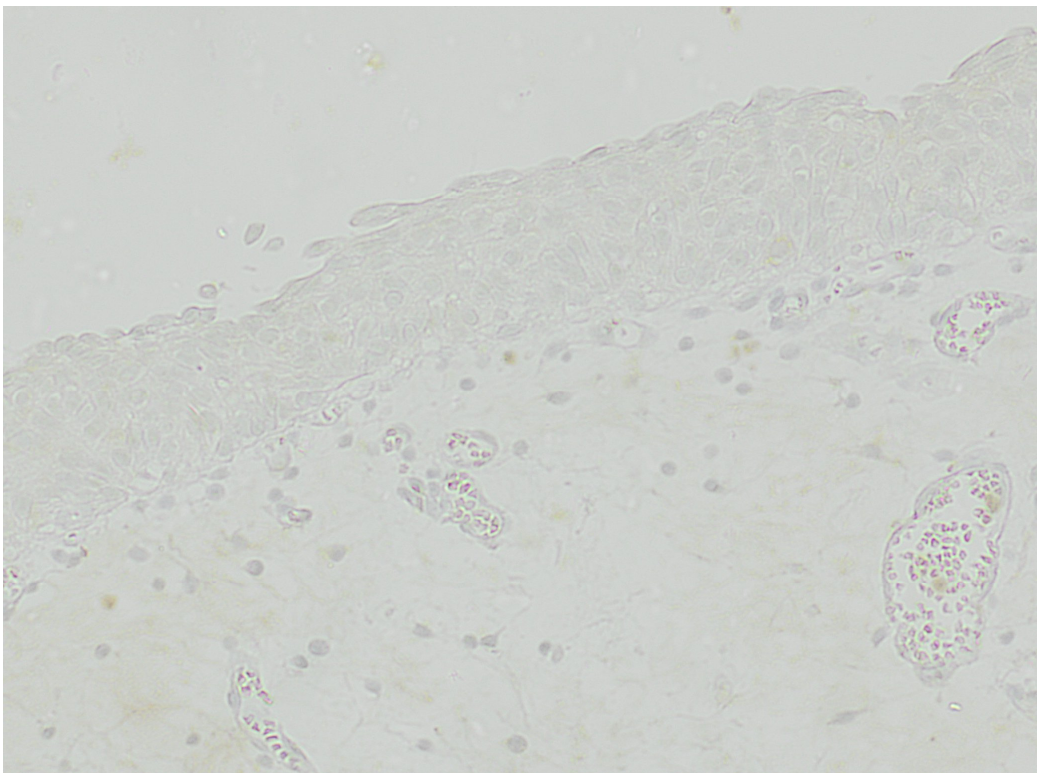


Abbildung 11: Patient 6, immunhistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der

Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

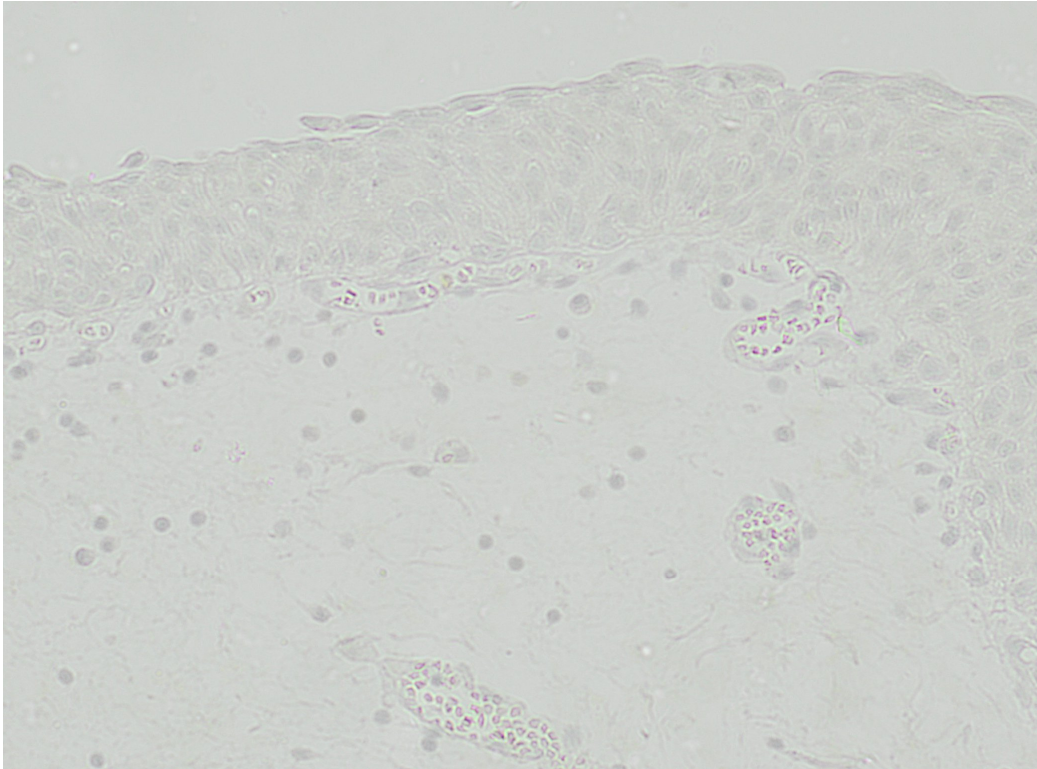


Abbildung 31: Patient 6, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx32 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

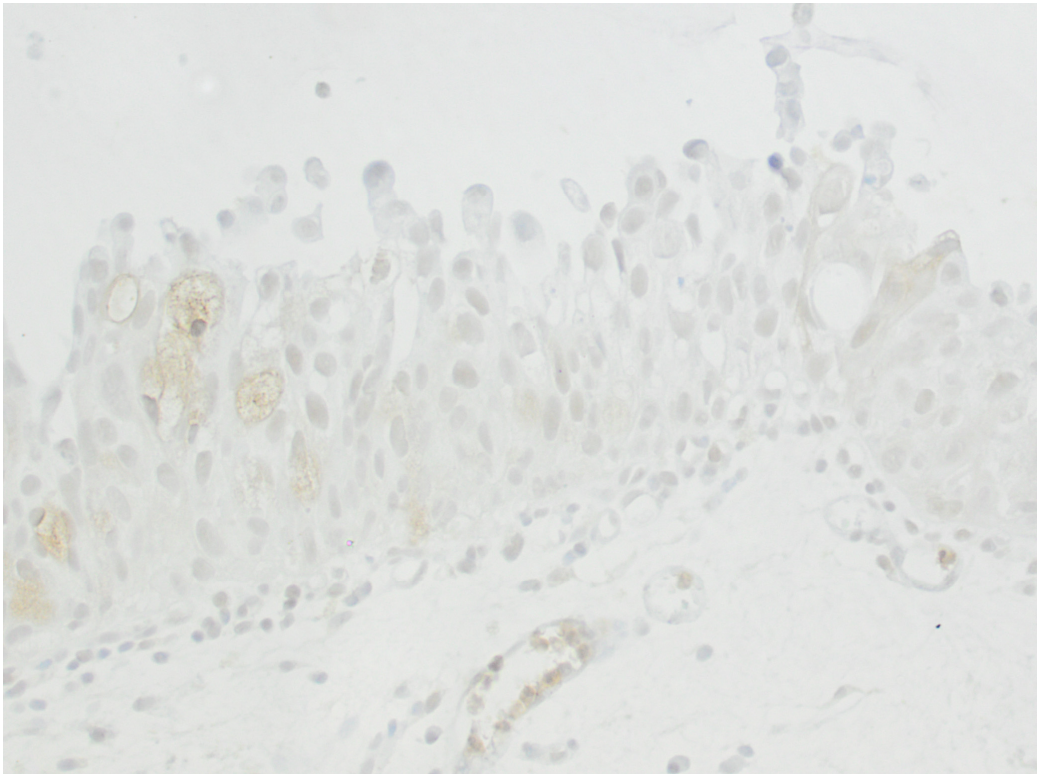


Abbildung 32: Patient 6, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich sowohl im Endothel als auch hauptsächlich im Tumorgewebe. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine deutliche spezifische Anfärbung von Cx43 zu erkennen.

Auf eine Abbildung der Präparate mit den immunhistochemischen Färbungen des Connexin 29 und des Connexin 36 beim sechsten Patienten wurde verzichtet, da die Färbungen keinen bräunlichen Farbniederschlag zeigten und somit negativ waren.

6.7 Siebenter Patient

65 Jahre alter Mann, Tumorstadium pTa, G2, im histologisch-pathologischen Befund: "Formation eines mäßig differenzierten, nicht invasiven, papillären Urothelkarzinoms (G2).

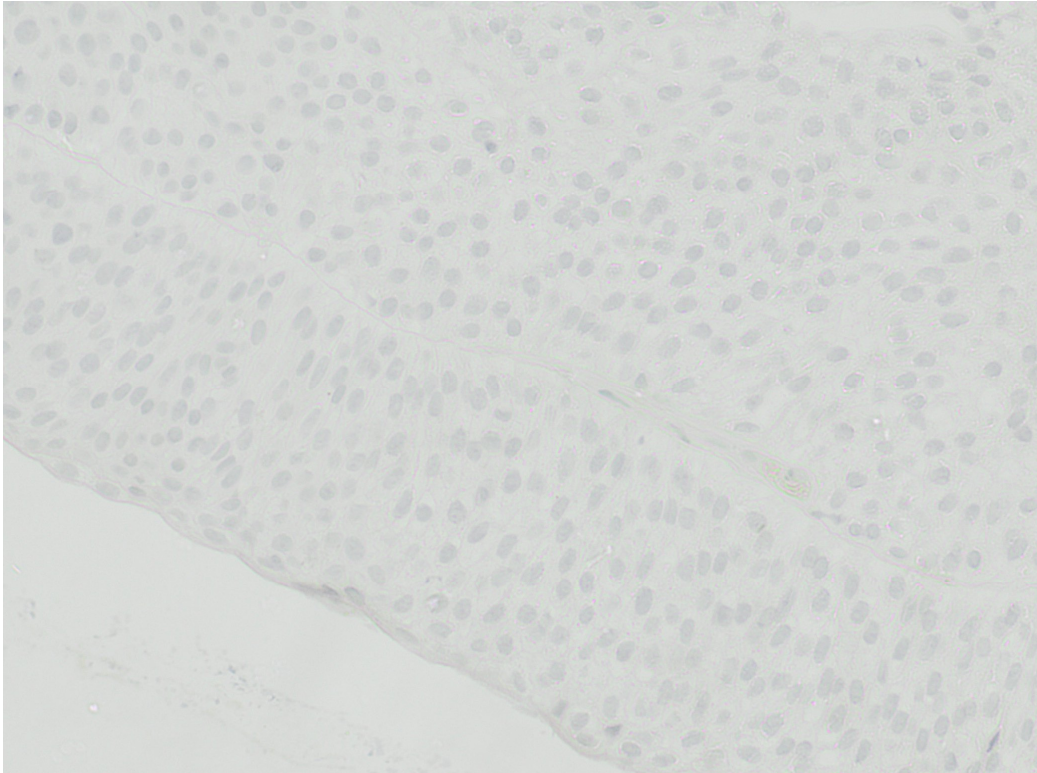


Abbildung 33: Patient 7, immunhistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

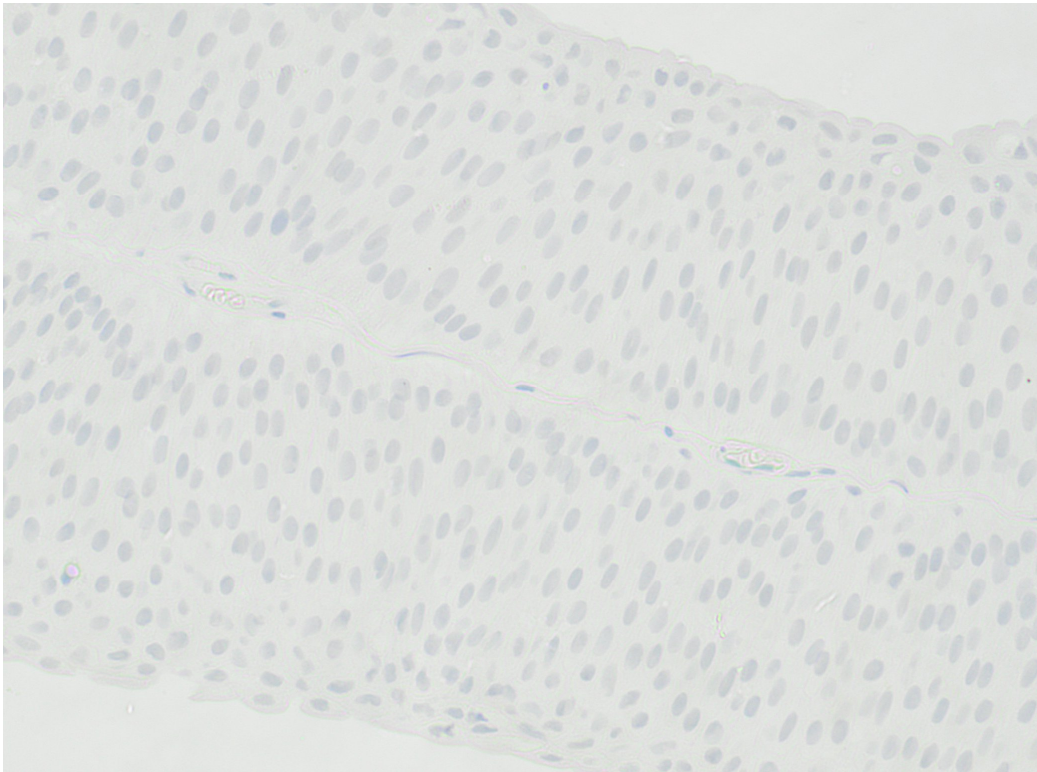


Abbildung 34: Patient 7, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx32 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

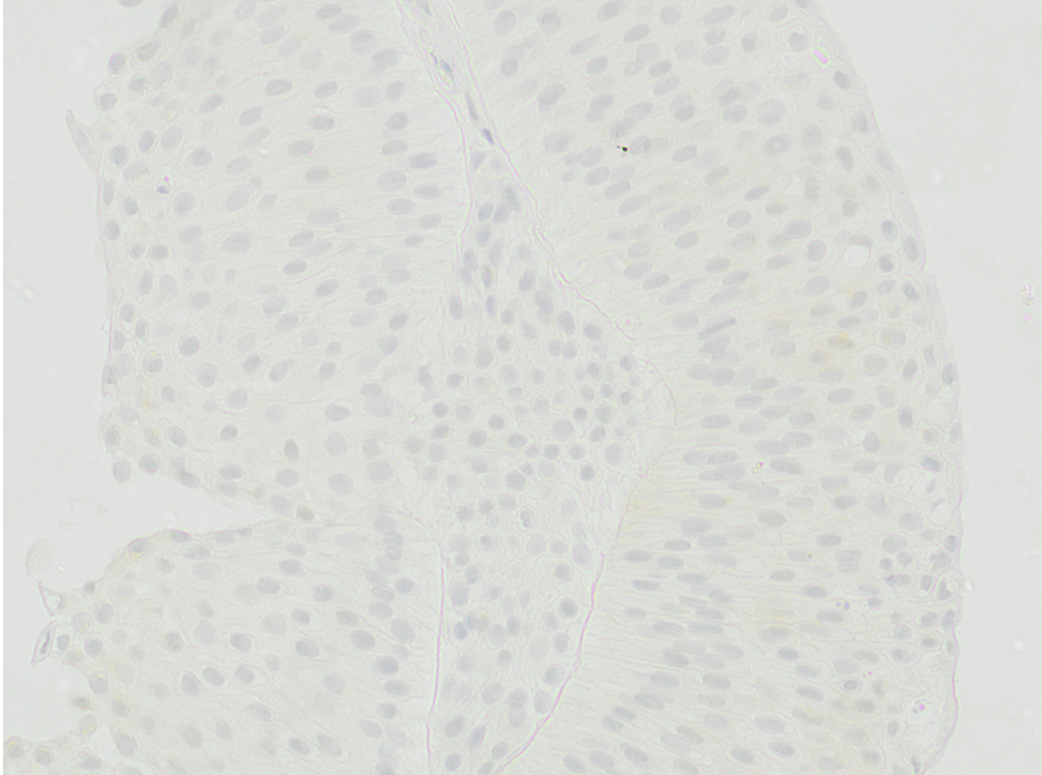


Abbildung 35: Patient 7, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung des Tumorgewebes durch einen bräunlichen Substratniederschlag gelingt nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine deutliche spezifische Anfärbung von Cx43 nicht zu erkennen.

Auf eine Abbildung der Präparate mit den immunhistochemischen Färbungen des Connexin 29 und des Connexin 36 beim siebten Patienten wurde verzichtet, da die Färbungen keinen bräunlichen Farbniederschlag zeigten und somit negativ waren.

6.8 Achter Patient

91 Jahre alter Mann, Tumorstadium pT2, G3, im histologisch-pathologischen Befund: "Gering differenziertes Urothelkarzinom (G3) mit Infiltration bis in die Muscularis propria sowie vorbestehendes nicht invasives papilläres Urothelkarzinom hohen Dysplasiegrades."

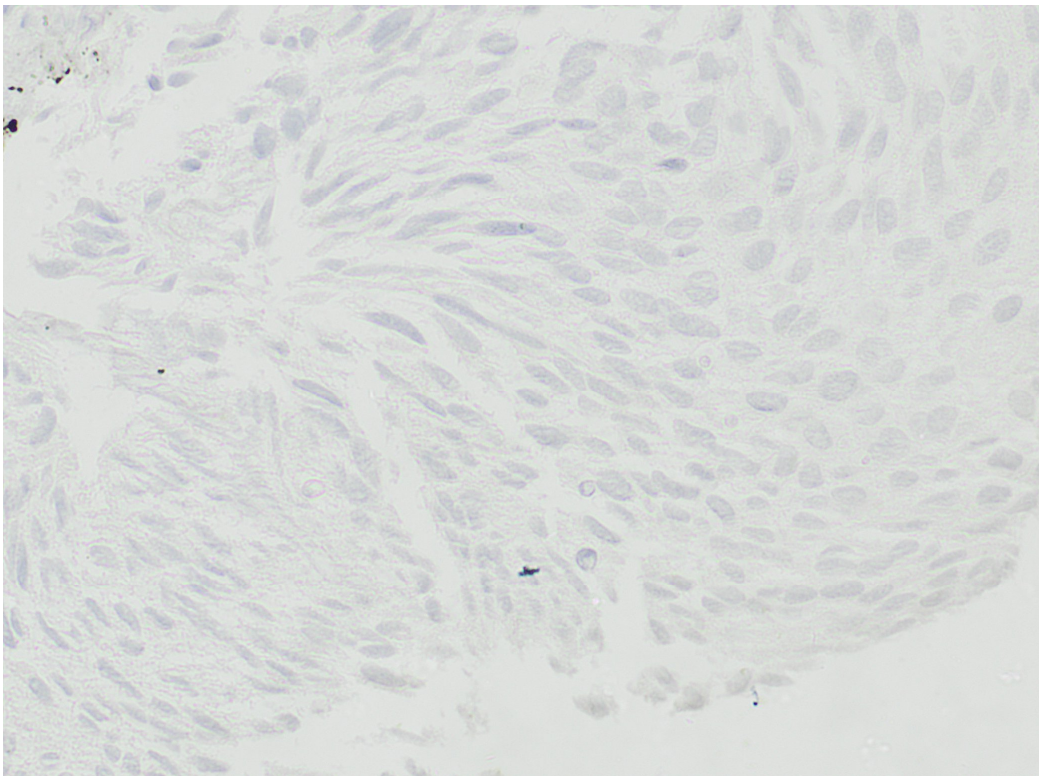


Abbildung 36: Patient 8, immunhistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

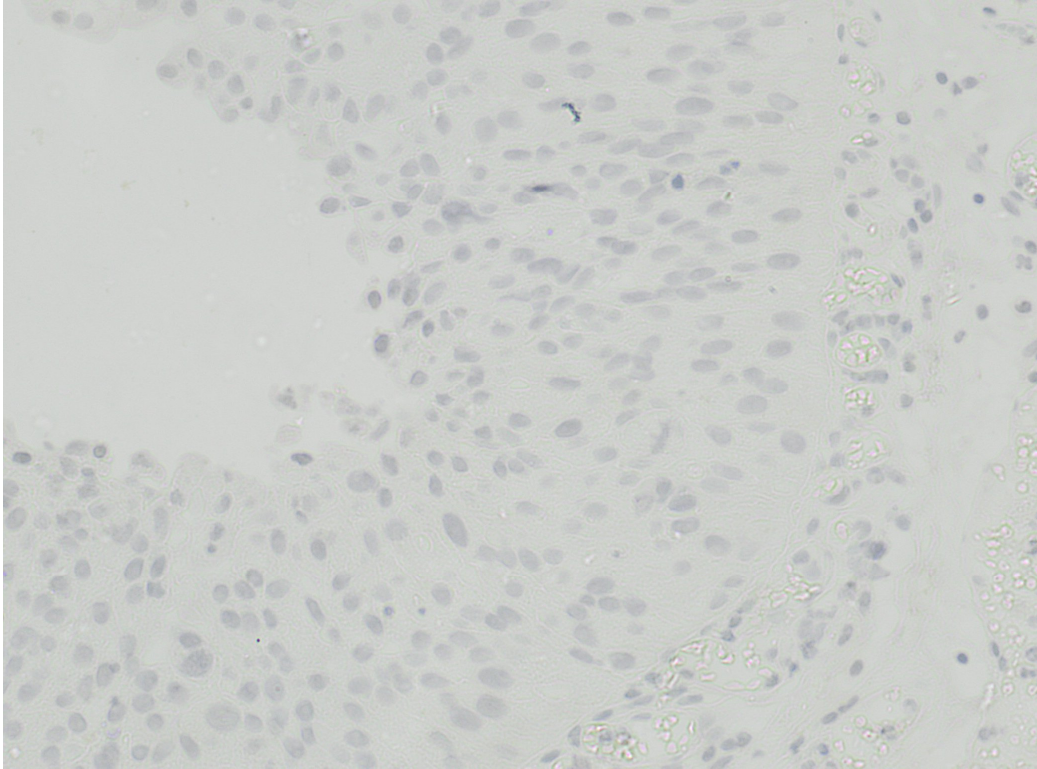


Abbildung 37: Patient 8, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx32 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

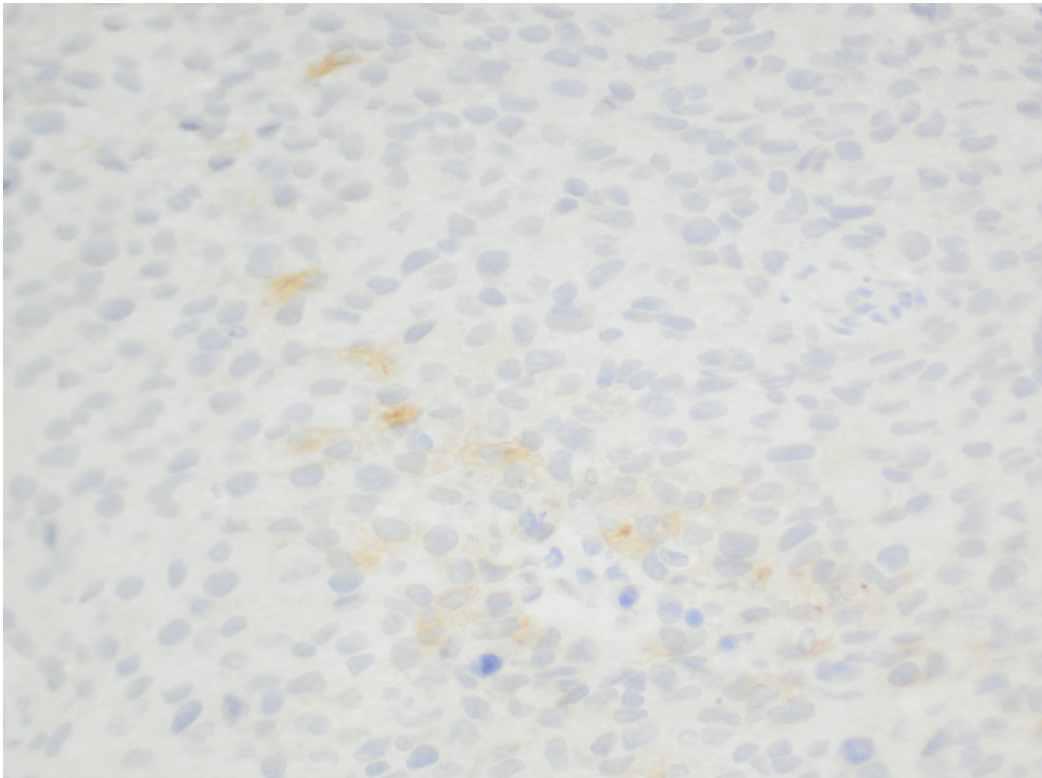


Abbildung 38: Patient 8, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen diffusen schwachen bräunlichen Substratniederschlag findet sich im Tumorgewebe. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine deutliche spezifische Anfärbung von Cx43 zu erkennen.

Auf eine Abbildung der Präparate mit den immunhistochemischen Färbungen des Connexin 29 und des Connexin 36 beim achten Patienten wurde verzichtet, da die Färbungen keinen bräunlichen Farbniederschlag zeigten und somit negativ waren.

6.9 Neunter Patient

47 Jahre alte Frau, Tumorstadium pTa, G2, im histologisch-pathologischen Befund: "Mittelgradig differenziertes papilläres nicht-invasives Urothelkarzinom (pTa,G2). Detrusormuskulatur ohne signifikanten pathologischen Befund."



Abbildung 39: Patient 9, immunhistochemische Färbung des Connexin 26 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx26 zu erkennen. Teilweise ist eine schwache blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

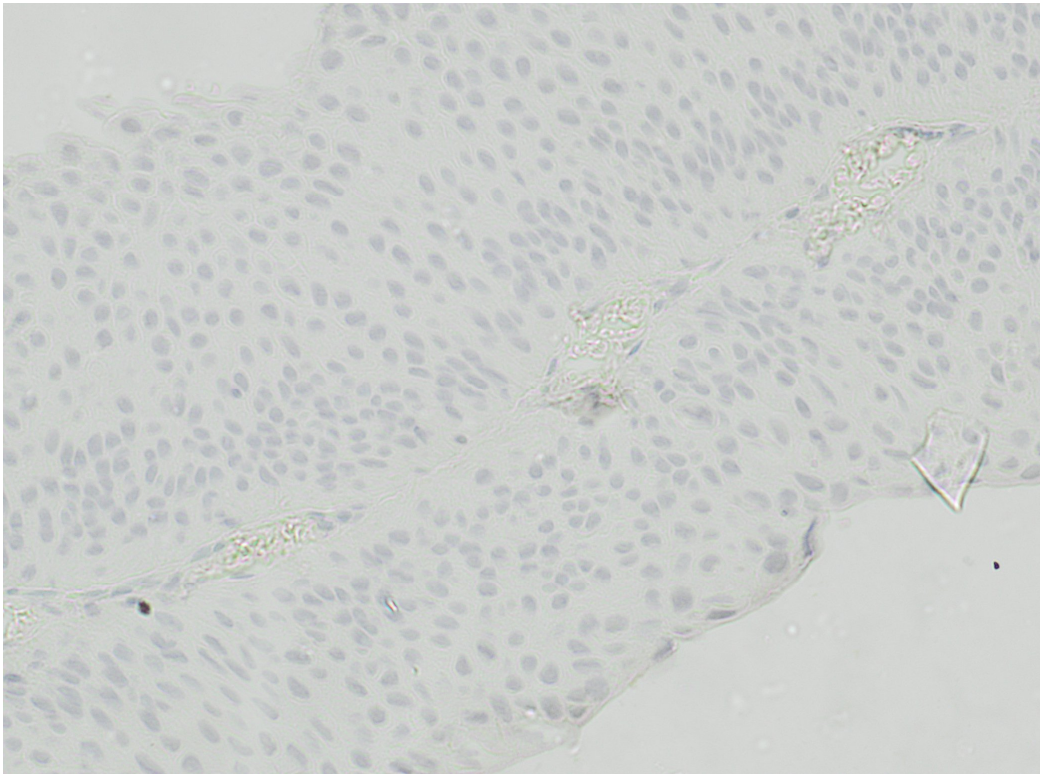


Abbildung 40: Patient 9, immunhistochemische Färbung des Connexin 32 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen bräunlichen Substratniederschlag findet sich nicht. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 μ m im Präparat.

In dieser Abbildung ist keine spezifische Anfärbung von Cx32 zu erkennen. Es ist eine blaue Hintergrundfärbung der Zellkerne zu sehen, die nicht als spezifisch gewertet wird. Ein spezifisches kräftig braunes Reaktionsprodukt wird nicht gefunden.

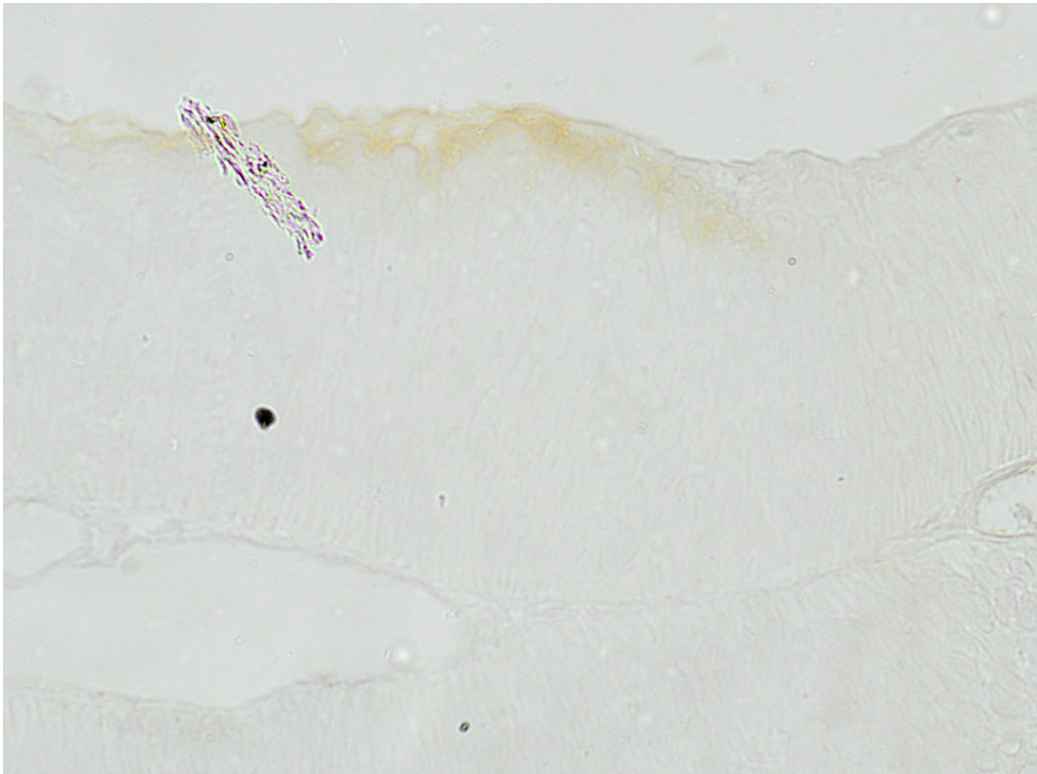


Abbildung 41: Patient 9, immunhistochemische Färbung des Connexin 43 an einem Paraffinschnitt. Eine Anfärbung durch einen schwachen bräunlichen Substratniederschlag findet sich in den wenigen Tumorzellen. Die Zellkerne stellen sich blau dar. 1 cm im Bild entsprechen 15 µm im Präparat.

In dieser Abbildung ist eine spezifische Anfärbung von Cx43 zu erkennen.

Auf eine Abbildung der Präparate mit den immunhistochemischen Färbungen des Connexin 29 und des Connexin 36 beim neunten Patienten wurde verzichtet, da die Färbungen keinen bräunlichen Farbniederschlag zeigten und somit negativ waren.

7. Diskussion

Weil sich Connexine in verschiedenen menschlichen Geweben nachweisen lassen, so z.B. in der glatten Muskulatur des Harnblasenmuskels, im Zellzwischenraum des gesunden Urothels und auch in Harnblasentumoren wurde zur eindeutigen Beantwortung der Fragestellung dieser Untersuchung als Nachweismethode die Immunhistochemie gewählt. Ihr Vorteil liegt in der eindeutigen Unterscheidung nicht nur ob überhaupt, sondern auch in welchem Gewebe eine immunhistochemische Reaktion ggf. stattgefunden hat. So können durch Erhalt eines mikroskopierbaren Präparates Farbniederschläge eindeutig der jeweiligen Struktur zugeordnet werden. Da eine transurethrale Elektresektion der Harnblase ein oberflächliches Abtragen der Harnblasenschleimhaut ist, finden sich in den untersuchten Präparaten auch nur oberflächliche Anteile der Harnblasenwand wie Schleimhaut, Lamina propria, Submukosa und selten auch Anteile der Muskularis. Zwischen Tumourothel oder gesundem Urothel kann ebenso unterschieden werden wie die Strukturen Lamina propria oder glatte Harnblasenmuskulatur abgegrenzt werden können. Daher ist ein mögliches anderes Nachweisverfahren wie z.B. ein Western Blot, welcher einen homogenisierten Gewebemix untersucht, nur begrenzt sinnvoll. Lediglich eine Laser-gestützte Mikrodisektion könnte noch eine eindeutige Zuordnung ermöglichen, erscheint aber bei größerem Aufwand und höheren Kosten keinen Vorteil zu bringen. Alle verwendeten Antikörper haben sich in vielen anderen Untersuchungen durch ihre Sensitivität und Spezifität als geeignet erwiesen und sind dadurch etabliert. Speziespezifische Antikörper sind nicht erforderlich, da sich die Antikörper durch die grundsätzlich hohe Strukturkonservierung der Connexine an den Connexinmolekülen speziesunabhängig anlagern. Das zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung auch in der sehr klaren

Darstellung der Glanzstreifen in der Herzmuskulatur. Es ist wichtig, zu betonen, dass die als positiv bewerteten Proben der Urothelkarzinome meist keinen vollständigen und homogenen Farbniederschlag zeigen, da Tumore selten einheitlich und homogen wachsen.

Erstmalig ist es in der vorliegenden Untersuchung gelungen Connexine in menschlichen Urothelkarzinomen nachzuweisen. Der Nachweis von Cx26 hat mit 2 von 9 und damit nur 22% positiven Proben keine spezifische Aussagekraft für das menschliche Urothelkarzinom. Li et al haben festgestellt, dass die Expression von Cx26 durch KDM5B im Urothelkarzinom mit zunehmender Malignität immer stärker unterdrückt wird (Li et al., 2013). Sie konnten keine Beziehung zu gutartigem Harnblasengewebe finden. Diese Eigenschaft erklärt die eigene Beobachtung, denn 6 der Proben entsprachen dem histopathologischen Grading G3. Interessanter Weise haben Corteggio A et al im Urothelkarzinom der Harnblase von Rindern beobachtet, dass die Expression von Cx43 mit zunehmender Karzinomentwicklung nachlässt (Corteggio A et al., 2013).

Die eigene Beobachtung zeigt im Gegensatz dazu in der menschlichen Harnblase durch den gelungenen Nachweis von Cx43 in 8 von 9 und damit 89% Proben eindeutig, dass Cx43 eine Bedeutung für das menschliche Urothelkarzinom hat. Diese Bedeutung scheint darin begründet zu sein, dass Cx43 die MAPK aktiviert (Ai et al., 2017).

Cx43 ist an der Bildung und dem Wachstum von menschlichen Urothelkarzinomen beteiligt und der Nachweis von Connexin 43 ist als tumorspezifisch zu werten. Das ist eine neue, bisher unbekannte Erkenntnis. Ob sich aus dieser Erkenntnis eine neue Therapiestrategie

gegen das menschliche Urothelkarzinom entwickeln lässt, oder ob der Nachweis von Cx43 als prognostischer Parameter zu werten ist, wie Poyet et al vermuten, kann aufgrund des kleinen Patientenkollektivs zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschliessend beantwortet werden (Poyet et al., 2015). Zhang et al vermuten mittlerweile, der Nachweis von Cx43 sei als Biomarker für invasives und/oder metastasierendes Wachstum eines Urothelkarzinoms zu werten (Zhang et al., 2017). Dieses sollte in weitergehenden Untersuchungen mit größeren Fallzahlen geprüft werden. Möglicher Weise können dazu derzeit im Aufbau befindliche Gewebbanken genutzt werden.

8. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick

Die wesentliche Erkenntnis der vorliegenden Untersuchung ist, dass der Nachweis von Connexin 43 in menschlichen Urothelkarzinomen in 8 von 9 Fällen, also 89% gelingt. Weil im Urothel einer gesunden menschlichen Harnblase kein Connexin 43 produziert wird, folgt daraus, dass Connexin 43 als tumorspezifisch oder wenigstens als mit dem menschlichen Urothelkarzinom assoziiert gewertet werden muss.

Eine weitere Erkenntnis ist, dass die seit einem Jahrzehnt vorliegende Vermutung, dass Connexin 43 protektiv gegen Entartungen in der menschlichen Harnblase wirkt, nicht wahrscheinlich ist und Connexin 43 im Gegenteil eher krebsfördernd oder zumindest krebsbegleitend zu sein scheint. Vermutlich ist die Synthese von Connexin 43 in den menschlichen Urothelzellen an der Bildung und dem Wachstum von menschlichen Urothelkarzinomen beteiligt.

Welche therapeutischen Möglichkeiten sich zukünftig daraus ergeben können müssen nachfolgende Untersuchungen mit umfangreicheren Patientenzahlen prüfen. Solche Untersuchungen liefern dann ggf Hinweise wie die Bildung von Connexin 43 beeinflusst, idealer Weise sogar verhindert werden kann.

9. Literaturverzeichnis

Asamoto M, Fukushima S, Imaida K, Shirai T, Takahashi S. Increased gap junctional intercellular communication capacity and connexin 43 and 26 expression in rat bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1994; 15/10: 2163-2166

Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol*. 1990 Jul;116:187-94

Bottemann MF, Pahos CL, Redelli A et al. The health economics of bladder cancer. *Pharmacoeconomics*. 2003; 21: 1315-1330

Corteggio A., Altamura G., Roperto F., and Borzacchiello G. Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? *Infect Agent Cancer*. 2013; 8: 1

Corteggio A, Florio J, Roperto F, Borzacchiello G. Expression of gap junction protein connexin 43 in bovine urinary bladder tumours. *J Comp Pathol*. 2011;144:86–90

Cronier L., Crespín S., Strale P.-O., Defamie N. and Mesnil M. Gap Junctions and Cancer: New Functions for an Old Story data present a complex picture of connexins in various functions, depending on the cell phenotype. *Antioxid. Redox Signal*. 11, 323–338.

Damyanov I., The Lower Urinary Tract and Male Reproductive System. In: R. Rubin, D. Strayer et al.: Rubin's Pathology. 5. Auflage. Philadelphia 2008, S. 752–758

Forschungsverbund Blasenkarzinom, http://www.forschungsverbund-blasenkarzinom.de/hintergrund_hbk.pdf, S. 306/307, Abruf 28.6.2017

Gee J., Tanaka M. and Grossman H.B. Connexin 26 is abnormally expressed in bladder cancer, The Journal of Urology, 2003, Vol. 169, S. 1135–1137

Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Apr;4:285-94

Holder JW, Elmore E, Barrett JC. Gap junction function and cancer. Cancer Res. 1993; 53: 3475-3485

Jocham D. Maligne Tumoren der Harnblase. In Jocham D, Miller K, Hrsg. Praxis der Urologie. Band II. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2007

John H, Wang X, Hauri D, Maake C. Gap junctions in der menschlichen Harnblase. Aktuel Urol 2003; 34: 328-332

Kandouz M, Batist G. Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. Expert Opin. Ther. Targets. 2010; 14:681-692

Klaunig JE. Biologie of disease. Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab. Invest.* 1990; 62: 135-146

Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 2006 Mar 15;394:527-43

Lee C, Gruschkus S, Colayco D. Treatment patterns and costs of treating non- muscle invasiv bladder cancer. Posterpräsentation 12th Annual Meeting of the Society of Urologic Oncology. 2011; November 30-December 2. Rockville MD

Leithe E, Sirnes S, Omori Y, Rivedal E. Downregulation of Gap junctions in Cancer cells. *Critical Reviews in Oncogenesis.* 2006; 12: 225-256

Li X, Su Y, Pan J, Zhou Z, Song B, Xiong E, Chen Z. Connexin 26 is down-regulated by KDM5B in the progression of bladder cancer. *Int J Mol Sci.* 2013 Apr 11;14:7866-79

Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1979; 560: 1-65

Mesnil M., Crespín S., Avanzo J-L., Zaidan-Dagli M-L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochimica et Biophysica Acta* 1719 (2005) 125 – 145

Murray AW, Fitzgerald DJ. Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in co-culture of epidermal and 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979; 91: 395-401

Pashoes CL, Bottemann MF, Laskin BL et al. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis and management. *Cancer Practice*. 2002; 10: 311-322

Phé V, Behr-Roussel D, Oger-Roussel S, Rouprêt M, Chartier-Kastler E, Le Bret, T, Karsenty G, Compérat E, Camparo P, Giuliano F. Involvement of connexins 43 and 45 in functional mechanism of human detrusor overactivity in neurogenic bladder. *Urology*. 2013 May;81:1108.e1-6

Poyet C, Buser L, Roudnicky F, Detmar M, Hermanns T, Mannhard D, Höhn A, Rüschhoff J, Zhong Q, Sulser T, Moch H, Wild PJ. Connexin 43 expression predicts poor progression-free survival in patients with non-muscle invasive urothelial bladder cancer. *J Clin Pathol*. 2015 Oct;68:819-24

Retamal MA, Reyes EP, García IE, Pinto B, Martínez AD, González C. Diseases associated with leaky hemichannels. *Front Cell Neurosci*. 2015 Jul 27;9:267

Robert Koch Institut, www.rki.de 2014: 100-104

Sommerauer M, Jocham D, Laturnus JM. Das nicht muskelinvasive Urothelkarzinom der Harnblase. *Urologe*. 2012; 51: 791-797

Trosko JE, Madhukar BV, Chang CC. Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicological and pharmacological implications. *Life Science*. 1993; 53:1-19

Yamasaki H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1990; 11: 1051-1058

Yotti LP, Chang CC, Trosko JE. Elimination of metabolic cooperation in chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science*. 1979; 206:1089-1091

Zhang R, Wang L, Garrett SH, Sens DA, Dunlevy JR, Zhou XD, Somji S. Elevated connexin 43 expression in arsenite-and cadmium-transformed human bladder cancer cells, tumor transplants and selected high grade human bladder cancers. *Exp Toxicol Pathol*. 2016 Oct;68:479-491

11. Danksagungen

Der Klinik für Urologie des Klinikums Saarbrücken unter der Leitung von Herrn Chefarzt Dr. med. Stephan Meessen danke ich sehr für die Unterstützung bei der Gewinnung der Gewebeproben, wie auch Herrn Dr. med. Axel Gauer vom Institut für Pathologie in Kaiserslautern für die Unterstützung bei der histologischen Auswertung. Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Carola Meier für die großzügige Überlassung der in dieser Untersuchung verwendeten Antikörper. Außerdem bin ich Frau Ingrid Lang für die hervorragende technische Unterstützung dankbar.

Ganz besonders möchte ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Thomas Tschernig für die Geduld und die konstruktiven Diskussionen danken sowie für die Überlassung des Themas.

11. Veröffentlichung

Comberg D, Gauer A, Tschernig T. First findings of gap junction proteins in human urothelial carcinoma. World J Urol. 2016;34:145-7